

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**

**ΦΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΜΕ ΘΕΜΑ**

**“Μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των ειδών  
της Οικογένειας Mullidae με μοριακές τεχνικές”**

**Μπάνη Μαρούλα**

**Επιτροπή  
Θεοδώρου Αθ. Καθηγητής (Επιβλέπων)  
Μαμούρης Ζ. Επίκουρος Καθηγητής  
Παναγιωτάκη Π. Λέκτορας**

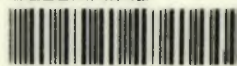
**ΒΟΛΟΣ, 1999**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 41/1  
Ημερ. Εισ.: 07-08-2003  
Δωρεά: \_\_\_\_\_  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ – ΓΦΖΠ  
1999  
ΜΠΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000070099

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ		ΣΕΛ.
ΠΡΟΛΟΓΟΣ		
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....		1
Η χρήση των μοριακών τεχνικών στη γενετική πληθυσμών.....		1
A. ΙΣΟΕΝΖΥΜΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ.....		2
1. Μελέτη διαφόρων ενζυμικών συστημάτων.....		2
2. Ενζυμικά συστήματα.....		4
B. RAPD.....		6
1. Ανάλυση και χρησιμότητα της τεχνικής RAPD.....		6
2. Εφαρμογές RAPD.....		8
3. Δυσκολίες και περιορισμοί της τεχνικής RAPD.....		10
4. Δυνατές μελλοντικές εφαρμογές .....		12
Γ. Μιτοχονδριακό DNA.....		12
1. Ανάλυση mtDNA.....		12
2. Ερευνες της ποικιλότητας του mtDNA.....		16
3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της ανάλυσης DNA .....		18
Δ. Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....		20
1. Η τεχνική .....		20
2. Χαρακτηριστικά της τεχνικής PCR.....		25
3. Πλεονεκτήματα και σημασία της τεχνικής PCR.....		26
E. Παρουσίαση της εργασίας.....		27
1. Σκοπός της εργασίας.....		27
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....		27
A. Βιολογικό υλικό.....		27
1. Μπαρμπούνι.....		28
2. Κουτσομούρα.....		29
3. Λοχίας.....		29
4. Μπαρμπούνι της Ανατολής.....		30
B. Μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν.....		31
1. Ισοενζυμική ανάλυση.....		31
Συστήματα ηλεκτροφόρησης ενζύμων.....		32
Ειδικές συνθήκες ηλεκτροφόρησης για κάθε ενζυμικό σύστημα.....		33
2. RAPD.....		38
Εξαγωγή και απομόνωση DNA.....		38
Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και συνθήκες ενίσχυσης .....		39
3. mtDNA.....		40
Διαδικασία ανάλυσης του mtDNA.....		40
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....		43
1. Δεδομένα Ισοενζύμων.....		43
2. Δεδομένα RAPD.....		46
3. Δεδομένα mtDNA.....		49
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....		53
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....		60

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η Διπλωματική αυτή Διατριβή, πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιολογίας, κατά τη χρονική περίοδο 1998 -1999.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Θεοδώρου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αναθέτοντάς μου την εργασία αυτή, καθώς και για την επίβλεψή του καθόλη τη διάρκεια.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Μαμούρη ο οποίος με τίμησε με την εμπιστοσύνη του, αναθέτοντάς μου την εργασία αυτή. Η συνεχής καθοδήγηση, το ενδιαφέρον, οι συμβουλές και οι υποδείξεις του ήταν καθοριστικοί παράγοντες για την διεκπεραίωση της διπλωματικής.

Ευχαριστώ ακόμη, την Λέκτορα κ. Παναγιωτάκη για το ενδιαφέρον που έδειξε για την επιτυχή εκπόνηση της διπλωματικής αυτής εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα Σταμάτη για το ενδιαφέρον και την βοήθεια που μου πρόσφερε μέχρι το πέρας της εργασίας αυτής.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1. Η χρήση των μοριακών τεχνικών στη Γενετική Πληθυσμών

#### Ιστορική Αναδρομή

Οι πρώτες μοριακές γενετικές τεχνικές λαμβάνουν χώρα στον τομέα της ιχθυολογίας το 1950. Αρχικά μελετήθηκαν παραλλαγές των ομάδων αίματος σε τόνους, σαλμονίδες και μουρούνες (de Ligny, 1969) και παρατηρήθηκε γενετικά ελεγχόμενος πολυμορφισμός, ο οποίος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στις αναλύσεις δομής των πληθυσμών. Ωστόσο, οι βιολόγοι στράφηκαν στη χρήση μεθόδων ηλεκτροφόρησης, οι οποίες αποκαλύπτουν γενετικά καθορισμένους πρωτεϊνικούς πολυμορφισμούς. Ο Sick (1961) ήταν ο πρώτος που περιέγραψε τις μεταβολές της αιμοσφαιρίνης στο ταούκι (*Gadus morhua*, Gadidae). Αργότερα (1966), οι Harris και Lewontin & Hubby, με μελέτες στον άνθρωπο και τη φρουτόμυγα *Drosophila pseudoobscura* αντίστοιχα, απέδειξαν τον εξαιρετικό πολυμορφισμό των ειδών αυτών για διάφορα ισοένζυμα, τα οποία ανιχνεύονταν μετά από ηλεκτροφόρηση. Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών αποδείχθηκε γρήγορη, φθηνή και σταθερά αναπαραγόμενη.

Πολλά είδη φυτών και ζώων, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών και των οστρακοειδών με εμπορική αξία, είχαν αρκετή γενετική παραλλακτικότητα, ώστε η εξέταση της δομής των πληθυσμών ήταν γρήγορη. Όμως οι ηλεκτροφορήσεις πρωτεϊνών και ισοενζύμων παρέχουν μία έμμεση εκτίμηση της μεταβλητότητας του πυρηνικού DNA. Άμεσες εκτιμήσεις της μεταβλητότητας του DNA επιτεύχθηκαν με την απομόνωση των ενδονουκλεασών περιορισμού. Αυτές είναι ένζυμα που «κόβουν» το DNA σε ειδικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες δίνοντας τμήματα DNA μεταβλητού μεγέθους, τα οποία διαχωρίζονται σε πηκτές ηλεκτροφόρησης, επιτρέποντας έτσι την άμεση μελέτη της μεταβλητότητας των αλληλουχιών DNA.

Το μιτοχονδριακό DNA εξετάστηκε πρώτο, λόγω του μεγέθους του και της ευκολίας απομόνωσής του. Στη συνέχεια ανακαλύφθηκε το πυρηνικό (nuclear DNA). Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) επιτρέπει απειροελάχιστες ποσότητες DNA να ενισχυθούν και να αναλυθούν. Μελέτες πάνω στην εφαρμογή ισοενζύμων και των δεικτών DNA στα ψάρια έχουν γίνει αρκετές. Οι Waldman & Wirgin (1994) έχουν αναφέρει τη χρήση των αναλύσεων DNA (όχι όμως των ισοενζύμων) στη

διαχείριση των αποθεμάτων των ψαριών και ο Skibinski (1994) έχει αναφέρει την εφαρμογή των αναλύσεων DNA στα θαλάσσια ασπόνδυλα ζώα.

Η μελέτη των γενετικών δεικτών έχει σημαντικές επιδράσεις σε τρεις περιοχές της ιχθυολογίας

1. Ανάλυση της δομής των ιχθυοαποθεμάτων των ψαριών
2. Υδατοκαλλιέργειες
3. Ταξινόμια-Συστηματική.

Η ανάγκη ταξινόμησης-συστηματικής ειδών της οικογένειας Mullidae και η εύρεση γενετικών δεικτών που να καθορίζουν τις φυλογενετικές σχέσεις ανάμεσα στα είδη αυτά οδήγησε στην εκπόνηση της εργασίας. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι τρεις γενετικές μέθοδοι, ισοένζυμα, RAPD, μιτοχονδριακό DNA.

## **A. ΙΣΟΕΝΖΥΜΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ**

### **1. Μελέτη διαφόρων ενζυμικών συστημάτων.**

Η ηλεκτροφόρηση ισοενζύμων παραμένει ο κυρίαρχος τρόπος μελέτης της γενετικής ποικιλομορφίας. Συγκεκριμένα, η ισοενζυμική ανάλυση παρέχει το πλεονέκτημα να γίνει γνωστή η γενετική δομή των πληθυσμών των ειδών, να εκτιμηθούν παράμετροι όπως ο βαθμός ετεροζυγωτίας, το ποσοστό των πολυμορφικών γονιδιακών τόπων ή ο μέσος αριθμός των αλληλομόρφων ανά γονιδιακό τόπο. Ακόμα, όσον αφορά ένα είδος, μπορεί να δώσει πληροφορίες όπως εάν τα άτομα προέρχονται όλα από ένα παμμικτικό πληθυσμό που βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg, ή από γενετικά διακριτές ομάδες. Επίσης μπορεί να βρεθούν αλληλόμορφα μοναδικά για τους πληθυσμούς κάθε είδους τα οποία να το χαρακτηρίζουν και να χρησιμοποιηθούν ως γενετικοί δείκτες. Επιπλέον μπορεί να υπολογισθεί ο βαθμός της διαπληθυσμιακής διαφοροποίησης και ο βαθμός της γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών.

Η λογική της τεχνικής της ηλεκτροφορητικής ανάλυσης της ενζυμικής ποικιλότητας είναι απλή. Τα ένζυμα αποτελούνται από μία ή περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα αποτελείται από μία ακολουθία αμινοξέων η οποία κωδικοποιείται από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του DNA του αντίστοιχου γονιδιακού τόπου. Έτσι, αλλαγές στην αλληλουχία των βάσεων του DNA ενδέχεται να επηρεάσουν την αλληλουχία των αμινοξέων των ενζύμων που κωδικοποιούν. Αυτές οι μεταλλάξεις πιθανόν να μεταβάλουν το φορτίο,

το μέγεθος ή το σχήμα των ενζύμων τροποποιώντας έτσι την κινητικότητά τους κάτω από την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου. Στη συνέχεια, με τις κατάλληλες εξειδικευμένες ιστοχημικές χρώσεις, τα προϊόντα κάθε γονιδιακού τύπου μπορούν να ταυτοποιηθούν σε ένα μίγμα πρωτεϊνών από ένα ιστό. Στις περισσότερες περιπτώσεις για πιο αξιόπιστα αποτελέσματα χρειάζεται να μελετηθεί ένας μεγάλος αριθμός γονιδιακών τύπων, άρα και διαφορετικών ενζύμων. Ο αριθμός των 20-25 γονιδιακών τύπων θεωρείται ως ο ελάχιστος για τον υπολογισμό των γονιδιακών συχνοτήτων και την εκτίμηση του βαθμού ετεροζυγωτίας.

Τα πλεονεκτήματα της ισοενzymικής ανάλυσης είναι πολυάριθμα. Αρχικά, η γρήγορη ανάλυση των δειγμάτων και το χαμηλό κόστος των χημικών που απαιτούνται. Δεδομένα εκατοντάδων ατόμων μπορούν να δουλευθούν σε λίγες μέρες ή εβδομάδες. Ο εξοπλισμός που απαιτείται είναι απλός και το προσωπικό μπορεί να εκπαιδευθεί γρήγορα εάν και σε μερικές περιπτώσεις το να εξηγήσει κανείς τα αποτελέσματα απαιτεί μεγάλη εμπειρία. Ας σημειωθεί ότι η ανάλυση πρωτεϊνών με γνωστή λειτουργία καθώς και η πληθώρα των αποτελεσμάτων για πολλά είδη που κανείς μπορεί να αντλήσει από τη βιβλιογραφία καθιστά ακόμα πιο αξιόπιστη τη μέθοδο των ισοενζύμων.

Οι δυσκολίες που μπορεί να συναντήσει κάποιος στην εφαρμογή της μεθόδου αυτής είναι η αυστηρή απαίτηση φρέσκου ή κατεψυγμένου δείγματος. Μάλιστα η συλλογή των ιστών και η ποσότητα αυτών χρειάζεται να είναι μεγάλη, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στη θανάτωση των ατόμων (η ανάλυση των ισοενζύμων απαιτεί την μεγαλύτερη ποσότητα υλικού από όλες τις άλλες μεθόδους DNA). Ένα ακόμα μειονέκτημα είναι ο μικρός αριθμός αλληλομόρφων για κάθε γονιδιακό τύπο που συνήθως ανιχνεύεται και η μελέτη μόνο των πρωτεϊνών αυτών που χρωματίζονται με ιστοχημικές χρώσεις. Δεν αποκλείεται επίσης ορισμένοι γονιδιακοί τύποι να υπόκεινται στη δράση της φυσικής επιλογής. Ας σημειωθεί τέλος, η δυσχέρεια ανάλυσης προτύπων σε περιπτώσεις πολυπλοκειδίας και οι περιορισμένες δυνατότητες της μεθοδολογίας (μικρό εύρος δυνατοτήτων).

Η ισοενzymική ανάλυση ήταν η κυρίαρχη γενετική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για τη διάκριση των ειδών όπως συνέβη σε ορισμένους τελεόστεους, συμπεριλαμβανομένων των *Sprattus* (Clupeidae) από τη Νέα Ζηλανδία (Smith & Robertson, 1981), τους τροπικούς καρχαρίες *Carharinus* (Carharinidae) της Βόρειας Αυστραλίας (Lavery & Shaklee, 1991) και άλλοι. Ενίστε, τα ισοένζυμα χρησιμοποιήθηκαν για να επιβεβαιώσουν ήδη υπάρχουσες ταξινομικές κατηγορίες,



με αποτέλεσμα διάφορες ταξινομικές ομάδες να συγχωνευτούν, ενώ διάφορες άλλες να διασπαστούν. Παραδείγματα από θαλάσσιους τελεόστεους περιλαμβάνουν το είδος *Maomao scorpis* (Kyphosidae) στη Νέα Ζηλανδία (Smith *et al*, 1979) και την αθερίνα *Atherina* (Atherinidae) στην Ευρώπη (Creech, 1991). Σε μερικές περιπτώσεις τα δεδομένα των ισοενζύμων οδηγούν στη συγχώνευση των ομάδων όπως με τα δύο είδη αστακού *Jasus edwardsii* και *Jasus novaehollandiae* από τη Νέα Ζηλανδία και την Αυστραλία αντίστοιχα (Booth *et al*, 1990).

## 2. Ενζυμικά συστήματα

Στην εργασία αυτή μελετήθηκαν 12 ενζυμικά συστήματα σε 18 γονιδιακούς τόπους. Τα ενζυμικά αυτά συστήματα και η γενετική βάση αυτών είναι γνωστά αφού έχουν μελετηθεί από προηγούμενους ερευνητές. Παρακάτω δίνονται πληροφορίες για κάθε ένα από αυτά τα συστήματα

### 1. Εστεράση (EST)

### 2. Ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (AAT)

Είναι διμερές ένζυμο που καταλύει με συνένζυμο τη φωσφορική πυριδοξάλη την αντίδραση

ασπαρτικό οξύ + α-κετογλουταρικό οξύ  $\longrightarrow$  οξαλοξικό οξύ + γλουταμινικό οξύ.

Εχουν περιγραφεί δύο διαφορετικές μορφές του ενζύμου, μία μιτοχονδριακή (mAAT) και μία κυτταροπλασματική (sAAT). Η πρώτη μετακινείται προς την κάθοδο σε ηλεκτροφόρηση σε ουδέτερο pH, ενώ η δεύτερη προς την άνοδο (Taggart *et al*, 1981). Στο μυϊκό ιστό με βάση το ηλεκτροφορητικό πρότυπο αναφέρεται η έκφραση ενός διπλασιασμένου γονιδιακού τόπου AAT-1, 2, ενώ στο συκώτι εκφράζεται ακόμη ένας γονιδιακός τόπος ο AAT-3 (Allendorf *et al*, 1977, Taggart *et al*, 1981).

### 3. α-γλυκεροφωσφορική αφυδρογονάση (AGP)

Είναι διμερές ένζυμο που καταλύει την αμφίδρομη αντίδραση

α-γλυκεροφωσφορικό οξύ + NAD  $\longrightarrow$  διυδροξυακετόνη + φωσφορικό οξύ + NADH

Στο μυϊκό ιστό εκφράζονται καλά δύο γονιδιακοί τόποι, οι AGP1, AGP2.

### 4. Γαλακτική αφυδρογονάση LDH

Είναι τετραμερές ένζυμο που καταλύει την παρακάτω αντίδραση

πυροσταφυλικό οξύ + NADH  $\longrightarrow$  γαλακτικό οξύ + NAD

Σε αναερόβιο περιβάλλον η φυσιολογική λειτουργία του ενζύμου είναι σημαντική γιατί σε περίπτωση έλλειψης οξυγόνου οξειδώνει το NADH που σχηματίζεται κατά τη



διάρκεια της γλυκόλυσης σε NAD, γεγονός που επιτρέπει τη συνέχιση της γλυκόλυσης. Στα ασπόνδυλα, η σύνθεση του ενζύμου καθορίζεται από ένα γονιδιακό τόπο. Επίσης, στα άγναθα υπάρχει μόνο ένας γονιδιακός τόπος, ενώ στα υπόλοιπα σπονδυλωτά το ένζυμο ανιχνεύεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς και στη βιοσύνθεσή του συμμετέχουν περισσότεροι του ενός γονιδιακοί τόποι. Σε ομογενοποίηση ιστών σπονδυλωτών διακρίνονται σε ηλεκτροφόρηση συνήθως μέχρι 5 ισοένζυμα με δράση LDH, ως αποτέλεσμα του συνδυασμού δύο γονιδιακών τόπων, των A και B. Πρόσφατες ανοσοχημικές μελέτες έδειξαν ότι ο μοναδικός γονιδιακός τόπος των αγνάθων παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια με τον γονιδιακό τόπο B παρά με τον A (Baldwin *et al*, 1987). Επίσης, σε αρκετά σπονδυλωτά εκφράζεται και ένας τρίτος γονιδιακός τόπος, ο C. Μελέτες της αλληλουχίας των αμινοξέων των τριών πολυπεπτιδίων (προϊόντων των τόπων A, B, C) έδειξαν ότι πιθανόν ο γονιδιακός τόπος C να είναι ο προγονικός και οι άλλοι δύο να έχουν προέλθει από διπλασιασμό του (Rehnse & Davidson, 1986).

#### 5. Αλκοολική δευδρογονάση (ADH)

#### 6. Υπεροξική δισμουτάση (SOD)

Είναι διμερές ένζυμο το οποίο καταλύει τη μετατροπή των ριζών του υπεροξειδίου (που παράγεται κατά την καταστροφή του DNA) σε υπεροξειδίο του υδρογόνου. Σε ένα επόμενο στάδιο, το ένζυμο μετατρέπει το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε νερό. Η SOD εκφράζεται στο συκώτι.

#### 7. Ισοκιτρική αφυδρογονάση (IDH)

Είναι διμερές ένζυμο που καταλύει την αντίδραση

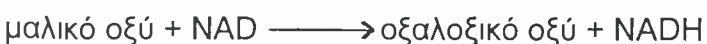


Η IDH εκφράζεται στο συκώτι.

#### 8. Οξειδάση της ξανθίνης (XO)

#### 9. Μαλική αφυδρογονάση (MDH)

Η μαλική αφυδρογονάση είναι ένζυμο του κύκλου του κιτρικού οξέος που καταλύει την αντίδραση



Το διμερές αυτό ένζυμο υπάρχει σε δύο μορφές, τη μιτοχονδριακή (mMDH) και την κυταροπλασματική (hMDH). Η MDH εκφράζεται στο συκώτι.

#### 10. Φωσφογλυκομουτάση (PGM)

Η φωσφογλυκομουτάση είναι ένζυμο της γλυκολυτικής οδού και καταλύει την αμφίδρομη αντίδραση

1-φωσφορική γλυκόζη  $\longrightarrow$  6-φωσφορική γλυκόζη

Είναι μονομερές ένζυμο το οποίο κωδικοποιείται από ένα γονιδιακό τόπο. Η PGM εκφράζεται στο μυικό ιστό.

11. Γλυκοζοφωσφορική ισομεράση (PGI)

Είναι διμερές ένζυμο που καταλύει την παρακάτω αντίδραση

6-φωσφορική γλυκόζη  $\longrightarrow$  6-φωσφορική φρουκτόζη

Η PGI εκφράζεται στο μυικό ιστό.

12. Κρεατινική κινάση (CK)

Είναι διμερές ένζυμο που καταλύει την αντίδραση

κρεατίνη + ATP  $\longrightarrow$  φωσφοκρεατίνη + ADP

Η CK των σπονδυλωτών παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με την αργινική κινάση (AK) των ασπονδύλων. Ανοσολογικές μελέτες και η ομοιότητα των ενεργών θέσεων των δύο ενζύμων οδηγούν στην υπόθεση ότι η CK προήλθε από την AK με διπλασιασμό. Η CK εκφράζεται στο μυικό ιστό και το μάτι.

## B. RAPD

### 1. Ανάλυση και χρησιμότητα της τεχνικής RAPD

Οι μοριακοί γενετικοί δείκτες έχουν αποδειχθεί ισχυρά εργαλεία στην ανάλυση γενετικών σχέσεων και γενετικής ποικιλομορφίας. Σαν επέκταση της πληθώρας των μοριακών τεχνικών που χρησιμοποιούν πολυμορφικούς δείκτες DNA, η τυχαία ενίσχυση πολυμορφικού DNA (RAPD) αποτελεί μία τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην μοριακή οικολογία για να καθορίσει την ταξινομική ταυτότητα των ειδών, να προσδιορίσει τις φυλογενετικές σχέσεις ανάμεσα σε είδη και να διαχωρίσει δείγματα ανάμικτου γονιδιώματος.

Η χρησιμοποίηση της μεθόδου RAPD έγινε εφικτή μετά τις προόδους στη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Η μέθοδος RAPD επιτρέπει την εξέταση της γενωμικής ποικιλότητας και έχει εφαρμοσθεί με απόλυτη επιτυχία στην εξέταση της ποικιλότητας σε πλήθος οργανισμών όπως στα βακτήρια (Welsh & McClelland, 1990), στα φυτά (Mailer *et al*, 1994), στα ποντίκια (Welsh *et al*, 1991), στις αφίδες (Black *et al*, 1992, Cenis *et al*, 1993), στους μύκητες (Lanfranco *et al*, 1995) και στα μυρμήγκια (Dewayne Shoemaker *et al*, 1994). Στα ψάρια, η μέθοδος RAPD χρησιμοποιήθηκε στην αναγνώριση ειδών και υποειδών στην τιλάπια. Σαν ένα πολύ ευαίσθητο εργαλείο

αναγνώρισης πυρηνικού DNA μπορεί να έχει καλύτερα αποτελέσματα από τα ισοένζυμα στον προσδιορισμό γενετικού πολυμορφισμού στα ψάρια ανάμεσα σε υποείδη ή σε πληθυσμούς του ίδιου είδους.

Στους θαλάσσιους οργανισμούς, οι περισσότερες εφαρμογές RAPD έγιναν στο επίπεδο διαχωρισμού των ειδών (Bardacki & Skibinski), εάν και οι Macaranas *et al*, 1995, χρησιμοποίησαν την RAPD μέθοδο για να διακρίνουν πληθυσμούς της καραβίδας του γλυκού νερού *Cherax quadricarinatus* στη Βόρειο Αυστραλία και ένας RAPD δείκτης βρέθηκε για τη θαλάσσια γαρίδα *Penaeus vannamei* (Garcia *et al*, 1996).

Τα πλεονεκτήματα της RAPD μεθόδου είναι

1. Η δυνατότητα μελέτης αγνώστων γονιδιωμάτων.
2. Η μελέτη του DNA όταν μόνο περιορισμένες ποσότητες είναι διαθέσιμες.
3. Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου και το μικρό κόστος της.

Η μέθοδος RAPD είναι αρκετά πρόσφατη. Για την καλύτερη κατανόησή της θα επιχειρηθεί η γνωστοποίησή της μέσα από τις αρχές της μεθόδου και τις εφαρμογές της. Η μέθοδος RAPD, χάρη στη χρήση της τεχνικής PCR έχει προσελκύσει το τεράστιο ενδιαφέρον των επιστημόνων αποτελώντας σε πολλές έρευνες απαραίτητο συμπλήρωμα στις άλλες τεχνικές ανάλυσης του DNA. Η σύλληψη της ανάλυσης RAPD είναι απλή. Ποσότητες νανογραμμαρίων ολικού γενωμικού DNA με τη χρήση μικρών συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων γνωστά ως εκκινητικά μόρια (primers) που περιέχουν τυχαίες αλληλουχίες υποβάλλονται στην τεχνική PCR. Οι συνθήκες ενίσχυσης στο PCR δεν είναι οι τυπικές PCR συνθήκες γιατί ως εκκινητικό μόριο χρησιμοποιείται ένα τυχαίο ολιγονουκλεοτίδιο και δεν απαιτείται η γνώση της αλληλουχίας του.

Τα τυπικά εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιούνται στην τεχνική PCR για να ενισχύσουν τις άγνωστες περιοχές του πυρηνικού DNA είναι μήκους 10-20 ζευγών βάσεων (bp). Όταν το εκκινητικό μόριο είναι μικρό (10 ζεύγη βάσεων), αρκετές θέσεις εκκίνησης με αντεστραμμένο προσανατολισμό μπορεί να εμπεριέχονται στο γονιδίωμα. Η τεχνική RAPD ανιχνεύει τις αντεστραμμένες επαναλήψεις και ενισχύει τα παρεμβαλλόμενα τμήματα DNA μεταβλητού μήκους.

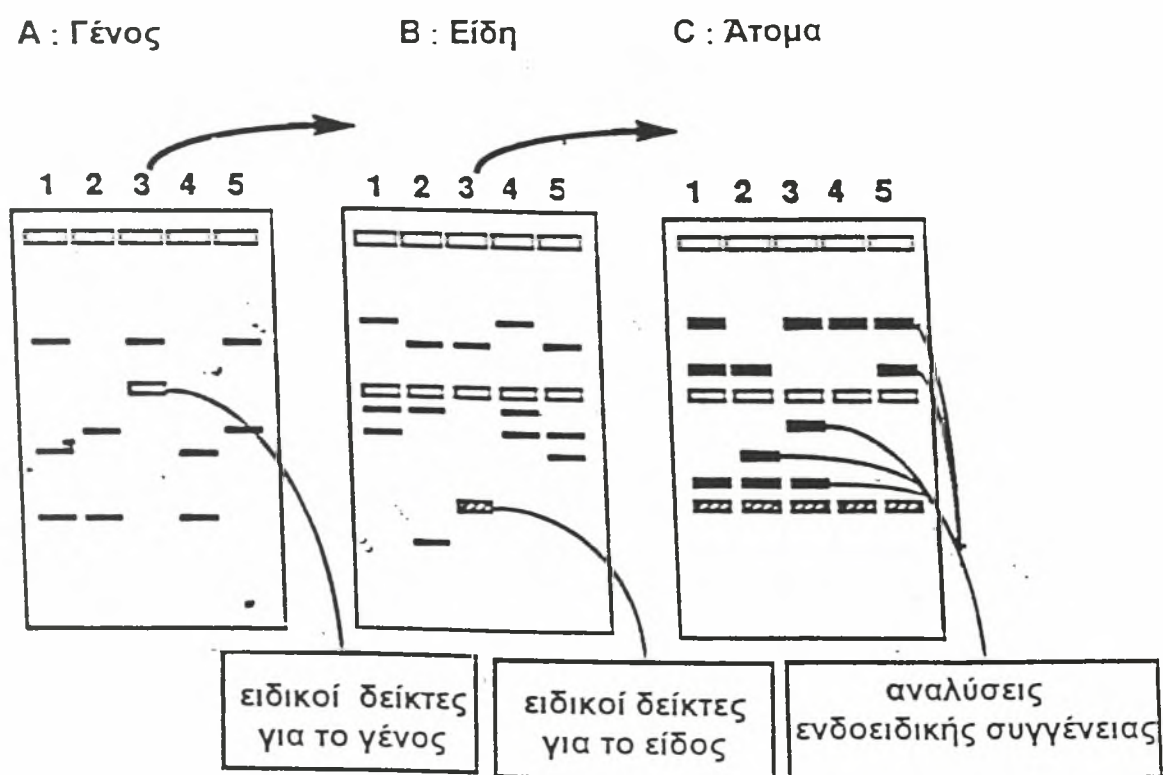
Το πρότυπο των προϊόντων ενίσχυσης εξαρτάται από τη σχέση DNA στόχου-εκκινητικού μορίου και αναπαράγεται για κάθε δεδομένο συνδυασμό. Τα προϊόντα ενίσχυσης αναλύονται σε πηκτές αгарόζης ή ακρυλαμίδης και οι πολυμορφισμοί χρησιμοποιούνται σαν κυρίαρχοι γενετικοί δείκτες, με μενδελική κληρονομηση.

## 2. Εφαρμογές RAPD

### 1. Προσδιορισμός ταξινομικών ταυτοτήτων.

Διαφορετικά εκκινητικά μόρια παράγουν διαφορετικούς μοριακούς χαρακτήρες, διαγνωστικούς σε διαφορετικά ταξινομικά επίπεδα (Εικ. 1). Για κάθε εκκινητικό μόριο, τα προϊόντα ενίσχυσης RAPD διακρίνονται στα

- μεταβλητά (πολυμορφικά) και τα
- σταθερά (μονομορφικά)



**Εικόνα 1.** Χρήση των πολυμορφικών και μη πολυμορφικών τμημάτων RAPD για την ανάλυση του γονιδιώματος.

Εστω για παράδειγμα μία ανάλυση RAPD ατόμων μέσα σε ένα είδος και ειδών ενός γένους. Και οι δύο τύποι προϊόντων μπορούν να αναγνωριστούν, σταθερά τμήματα, διαγνωστικά για ένα γένος, πολυμορφικά μεταξύ ειδών μέσα στο γένος. Και οι δύο τύποι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ταξινομικό επίπεδο.

## 2. Ανάλυση της ενδοειδικής ροής γονιδίων και του υβριδισμού.

Η τεχνική RAPD χρησιμοποιείται για την ανάλυση της συγχώνευσης γενοτύπων σε διαφορετικά ταξινομικά επίπεδα. Στο επίπεδο του ατόμου, οι δείκτες RAPD μπορούν να εφαρμοστούν στην ανάλυση καταγωγής. Στο επίπεδο πληθυσμού ή είδους, η μέθοδος RAPD μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση υβριδικών πληθυσμών ή ειδών. Η ανίχνευση των γενοτυπικών υβριδίων βασίζεται στην αναγνώριση ύστερα από έρευνα των διαγνωστικών δεικτών RAPD για τους πατρικούς γενότυπους. Στην περίπτωση του υβριδισμού, RAPD δείκτες άρχισαν να χρησιμοποιούνται όταν τα ισοένζυμα αποδείχτηκαν ανεπαρκή για τους υβριδικούς γενότυπους.

## 3. Προσδιορισμός της πατρότητας και των σχέσεων συγγένειας.

Χρησιμοποιώντας τμήματα που είναι πολυμορφικά ανάμεσα στα άτομα, η ανάλυση RAPD μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον προσδιορισμό της πατρότητας και της σχέσης συγγένειας από έναν αριθμό πιθανών πατέρων σε ένα μεγάλο δείγμα απογόνων. Για καλύτερα αποτελέσματα κατά τη στατιστική επεξεργασία προτείνεται αύξηση των διαγνωστικών εκκινητικών μορίων, επομένως και αύξηση των πολυμορφικών δεικτών.

Θεωρητικά, οι δείκτες RAPD μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν Μεντελικά αλληλόμορφα και για την ποσοστιαία ανάλυση, αναλυτικές προσεγγίσεις μπορούν να αναπτυχθούν, βασιζόμενες στις συχνότητες των αλληλομόρφων. Στην πράξη ωστόσο, οι συχνότητες των αλληλομόρφων των κυρίαρχων δεικτών RAPD στους διπλοειδείς οργανισμούς μπορεί να είναι δύσκολο να εκτιμηθούν και δείκτες προερχόμενοι από το ίδιο εκκινητικό μόριο μπορεί να συνδέονται. Συνθετικοί απόγονοι μπορούν να παραχθούν αναμιγνύοντας ίση ποσότητα DNA από τη μητέρα και τον πιθανό πατέρα. Τα προϊόντα ενίσχυσης από τους συνθετικούς απογόνους θα περιέχουν στην ιδανική περίπτωση ολόκληρο τον αριθμό των ζωνών.

## 4. Ανάλυση δειγμάτων μικτού γονιδιώματος.

Η τεχνική RAPD μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ποσοτικών εκτιμήσεων των σχετικών αναλογιών διαφορετικών γονιδιωμάτων σε δείγματα μικτού DNA. Σε πολλά πολυγαμικά συστήματα σύζευξης κυρίως έντομα και ψάρια,



ανταγωνισμός σπέρματος και μικτή πατρότητα λαμβάνουν χώρα. Στην περίπτωση αυτή η επιβεβαίωση της παρουσίας περισσοτέρων του ενός πατρικών γενοτύπων είναι επιθυμητή. Επίσης οι πολυμορφικές ζώνες πρέπει να είναι καλά ενισχυμένες, ενώ είναι απαραίτητη η ακριβής γνώση των διαγνωστικών δεικτών για κάθε γονιδίωμα που εξετάζεται.

#### 5. Παραγωγή νέων ειδικών ανιχνευτών.

Κάθε διαγνωστικός δείκτης μπορεί να απομονωθεί από την πηκτή αгарόζης, να επανενισχυθεί και να ραδιοαναλυθεί ξανά. Τέτοιες αναλύσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αποκλείσουν την πιθανότητα ταυτόχρονης μετακίνησης τμημάτων διαφορετικών αλληλουχιών αλλά του ίδιου μεγέθους τα οποία δεν διακρίνονται μεταξύ τους.

Η εξειδίκευση των δεικτών μπορεί να βελτιωθεί περαιτέρω, απομονώνοντας τις διαγνωστικές ζώνες RAPD από την πηκτή αгарόζης, επανανιχνεύοντάς τες και επιλέγοντας ένα μέρος της διαγνωστικής ζώνης σαν ανιχνευτή.

### 3. Δυσκολίες και περιορισμοί της τεχνικής RAPD

Τα τεχνικά ζητήματα που θα αναλυθούν παρακάτω και οι ενδεχόμενες δυσκολίες σε μία μελέτη RAPD αξίζουν μεγάλης προσοχής.

#### 1. Το μέγεθος του εκκινητικού μορίου.

Το μέγεθος του εκκινητικού μορίου θα καθορίσει το βαθμό της ειδίκευσης στην ανίχνευση ενός γονιδιώματος. Είναι αναμενόμενο τα εκκινητικά μόρια μικρού μήκους να ενισχύουν έναν υπερβολικά μεγάλο αριθμό αλληλουχιών, ώστε αυτές να δίνουν τις επαρκείς πληροφορίες. Πέρα από ένα συγκεκριμένο μέγεθος εκκινητικού μορίου (περίπου 10 νουκλεοτίδια), ελαττώνοντας το μήκος του εκκινητικού μορίου μπορεί επίσης να αυξηθεί και η τυχαία συγκόλλησή του με τον DNA στόχο και συνεπώς να αυξηθεί η πιθανότητα τυχαίας ενίσχυσης μη αναπαραγόμενων προτύπων.

Ολες οι μελέτες που χρησιμοποίησαν τις τυπικές συνθήκες RAPD με διαχωρισμό των δειγμάτων σε πηκτές αгарόζης συμπέραναν ότι τα εκκινητικά μόρια μεγέθους 10 bp είναι τα πιο αποτελεσματικά.

#### 2. Η ευαισθησία στις συνθήκες αντίδρασης.

Οι κυριότεροι περιορισμοί της RAPD τεχνικής προέρχονται από την ευαισθησία στις συνθήκες αντίδρασης της PCR. Ακόμα και οι μικρότερες αλλαγές στις συνθήκες μπορεί να επηρεάσουν την αναπαραγωγή των προϊόντων ενίσχυσης. Η ευαισθησία της τεχνικής αφορά

- A. Το είδος (διαμόρφωση) του θερμοκρασιακού προτύπου,
- B. Τον τύπο της χρησιμοποιούμενης πολυμεράσης,
- Γ. Τη συγκέντρωση των ιόντων Mg.

Το πρότυπο της ενίσχυσης είναι ιδιαίτερος ευαίσθητο στη συγκέντρωση της Ταq πολυμεράσης και στη συγκέντρωση του DNA. Το είδος του θερμοκρασιακού προτύπου είναι μία ιδιότητα των θερμικών κύκλων και θα πρέπει να τυποποιείται. Μόνο αυστηρά τυποποιημένες συνθήκες μπορούν να εγγυηθούν αναπαραγόμενα προϊόντα ενίσχυσης. Επιπλέον, η ιδανική συγκέντρωση DNA-στόχου ανά αντίδραση μπορεί να αποκλίνει από τις τυπικές συνθήκες (25 ngr ανά αντίδραση), αφού εξαρτάται από τον χρησιμοποιούμενο συνδυασμό εκκινητικού μορίου-DNA-στόχου.

### 3. Η πιθανότητα της ταυτόχρονης μετατόπισης ορισμένων ζωνών DNA.

Προυπόθεση για τη χρήση της τεχνικής RAPD είναι ότι τα προϊόντα ενίσχυσης είναι μοναδικά, επομένως τμήματα διαφορετικών αλληλουχιών, που μετατοπίζονται ταυτόχρονα λόγω του ίδιου μεγέθους τους, δεν ανιχνεύονται σε πηκτή αгарόζης ως ξεχωριστά τμήματα αφού η ταχύτητα μετακίνησής τους είναι η ίδια. Για τον διαχωρισμό των ζωνών αυτών χρησιμοποιούνται τεχνικές ραδιοεντοπισμού ή ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

### 4. Μη αναπαραγόμενα προϊόντα ενίσχυσης.

Όπως συμβαίνει και με άλλους γενετικούς δείκτες, έτσι και μερικά τμήματα της τεχνικής RAPD μπορεί να είναι ασαφή και όχι εύκολα ανιχνεύσιμα. Αυτά τα μη αναγνώσιμα και μη αναπαραγόμενα προϊόντα ενίσχυσης τα οποία μπορεί να προέρχονται από μη ειδικά εκκινητικά μόρια δεν έχουν αξία ως γενετικοί δείκτες. Ωστόσο, όταν η τεχνική ενίσχυσης RAPD εφαρμοσθεί για δύο ή περισσότερες φορές, η πλειονότητα των δεικτών αναπαράγονται σωστά και ανιχνεύονται εύκολα.

Όπως συμβαίνει και σε πολλές περιπτώσεις χρήσης της τεχνικής PCR, μερικές φορές τα προϊόντα ενίσχυσης εμφανίζονται ακόμα και με έλλειψη DNA-στόχου στην αντίδραση. Παρόλα αυτά, σε όλες τις δημοσιευμένες μελέτες αυτές οι ζώνες «φαντάσματα» εμφανίζονται όταν πρότυπο DNA έχει σίγουρα προστεθεί στην αντίδραση.

### 5. Άλλα ζητήματα

Οι πιο γνωστές τεχνικές χρήσης DNA διαφέρουν ουσιαστικά στα εξής

- Πολυπλοκότητα των τεχνολογικών διαδικασιών.
- Απαιτούμενη ποσότητα DNA.
- Σειρά των πληροφοριών που χρειάζονται για να ανιχνευθεί ένα γονιδίωμα.



- Αναλυτική δύναμη (ισχύς) για τον καθορισμό της γενοτυπικής συσχέτισης.
- Κόστος σε εργαστήρια και χρήματα.
- Εύρος εφαρμογών.

Σε αυτό το πνεύμα, η τεχνική RAPD φαίνεται να έχει μεγάλες δυνατότητες εφαρμογής στη μοριακή οικολογία και απαιτεί σχετικά μικρή τεχνολογία και τεχνογνωσία.

#### **4. Δυνατές μελλοντικές εφαρμογές.**

Εδώ θα αναφερθούν διάφορες εφαρμογές που είναι υπό ανάπτυξη.

##### **1. Προσδιορισμός του φύλου.**

Σε πολλές οικολογικές εφαρμογές θα ήταν χρήσιμο να υπήρχαν διαθέσιμοι δείκτες που να είναι προσδιοριστικοί για το φύλο. Αναμένονται κάποιες δυσκολίες στην ανάπτυξη δεικτών RAPD με αυτό το χαρακτηριστικό.

##### **2. Παραγωγή ειδικών εκκινητικών μορίων PCR για ανώνυμα γονιδιώματα.**

Μεγάλος περιορισμός της εφαρμογής PCR σε οικολογικά προβλήματα είναι η απουσία πληροφοριών για την αλληλουχία DNA στην πλειονότητα των οργανισμών. Η δυσκολία αυτή μπορεί να υπερνικηθεί σε πολλές εφαρμογές χρησιμοποιώντας μία τεχνική βασιζόμενη στην RAPD για την ανάπτυξη επιθυμητών εκκινητικών μορίων PCR.

##### **3. Ποσοτικές αναλύσεις μικτών βιολογικών δειγμάτων.**

Αναλογικά με τις αναλύσεις δειγμάτων μικτής πατρότητας μπορούν να εκτελούνται και αναλύσεις δειγμάτων πεδίου σε διαφορετικά είδη (π.χ. δείγματα πλαγκτού)

##### **4. Φυλογένεση.**

Οι δείκτες RAPD μπορεί να αποδειχτούν χρήσιμοι χαρακτήρες στην κλαδιστική ανάλυση.

### **Γ. Μιτοχονδριακό DNA**

#### **1. Ανάλυση mtDNA**

Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταροπλασματικά οργανίδια των ευκαρυωτικών κυττάρων τα οποία έχουν το δικό τους DNA, το μιτοχονδριακό (mt) DNA. Το mtDNA είναι απλοειδές, δίκλωνο κυκλικό, μόριο. Έχει σχετικά μικρό μέγεθος και μπορεί εύκολα να απομονωθεί. Συγκεκριμένα, το μέγεθος του μιτοχονδριακού γονιδιώματος των ζώων κυμαίνεται από 14000 ζευγάρια βάσεων (στο νηματώδη *Caenorhabditis*

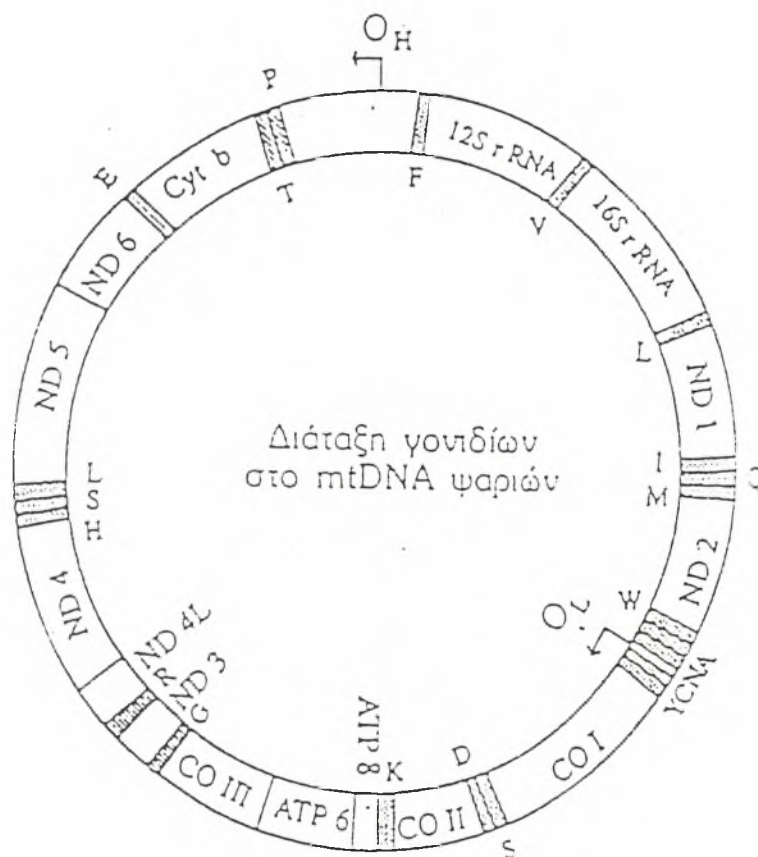
*elegans*), μέχρι 42 kb (στο χτένι *Placopecten megellanicus*), ενώ στα περισσότερα ζώα είναι γύρω στις 16-20 kb (Wolstenholme, 1992).

Η απομόνωση του mtDNA των 16-20 kb από τα δισεκατομμύρια άλλα νουκλεοτίδια του γονιδιώματος είναι σχετικά εύκολη λόγω φυσικού διαχωρισμού αυτού. Το mtDNA δεν ανασυνδυάζεται και μεταβιβάζεται σχεδόν αποκλειστικά μητρικά. Παρουσιάζει ταχύτερο ρυθμό αλλαγών σε σχέση με το πυρηνικό DNA, στην αλληλουχία των βάσεων του. Έτσι μπορούν να εντοπιστούν διαφορές μεταξύ των πληθυσμών ακόμη και σε περιπτώσεις όπου οι πληθυσμοί είναι ίδιοι στο επίπεδο του πυρηνικού DNA.

Το ζωικό mtDNA παρουσιάζει μία σαφή συντηρητικότητα ως προς τα γονίδια που περιέχει. Πράγματι, το mtDNA των σπονδυλωτών, εχινόδερμων και εντόμων περιλαμβάνει 13 γονίδια που μεταφράζονται σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες, 2 γονίδια για ριβοσωμικά RNA (12s και 16s rRNA) και 22 γονίδια για μεταφορικά RNA (tRNA), όπως και μία περιοχή που δεν κωδικοποιεί αλλά περιέχει τις αρχικές θέσεις για την αντιγραφή του mtDNA και τη μεταγραφή του σε RNA, γνωστή ως περιοχή ελέγχου ή βρόγχος D (D-loop). Τα μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτείνες καθορίζουν υπομονάδες ενζύμων που εμπλέκονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα. Αυτά είναι, οι 7 υπομονάδες αφυδρογονάσης του NADH (ND 1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6), μία υπομονάδα του κυτοχρώματος b, τρεις υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (CO I, II, III) και δύο υπομονάδες της μιτοχονδριακής συνθετάσης του ATP (ATPάση 6, 8) (Εικ. 2). Για τη λειτουργία όμως των βιοχημικών αντιδράσεων των μιτοχονδρίων χρειάζονται περισσότερα ένζυμα, η πλειοψηφία των οποίων καθορίζεται από το πυρηνικό DNA, συντίθεται στο κυτταρόπλασμα και εισάγεται στα μιτοχόνδρια. Προφανώς το εξαρτώμενο από τον πυρήνα μιτοχονδριακό γονιδίωμα του σήμερα είναι αποτέλεσμα της προοδευτικής μεταφοράς του γενετικού ελέγχου στον πυρήνα από ένα προηγούμενο πιο σύνθετο και μεγαλύτερο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Meyer, 1993).

Η απουσία ενδονίων, ψευδογονιδίων, επαναλαμβανόμενου DNA και μεγάλων ακολουθιών που να παρεμβάλλονται μεταξύ των γονιδίων του, καθιστά το mtDNA παράδειγμα γενετικής οικονομίας στη φύση. Εξάλλου, οι περισσότερες από τις γενετικές αλλαγές που παρατηρούνται είναι απλές αντικαταστάσεις βάσεων, άλλες είναι μικρές προσθήκες ή ελλείμματα (ενός ή λίγων νουκλεοτιδίων), ενώ λιγότερες περιλαμβάνουν μεγάλες αλλαγές (μέχρι αρκετές 100άδες νουκλεοτίδια) στο

μήκος του μορίου. Οι περισσότερες διαφορές μήκους περιορίζονται στην περιοχή ελέγχου του μορίου.



**Εικόνα 2.** Η διάταξη των γονιδίων στο μιτοχονδριακό DNA των ψαριών. Η έναρξη της αντιγραφής της αλυσίδας Η (OH) είναι στην περιοχή του βρόγχου εκτόπισης και η έναρξη της αλυσίδας L (OL) είναι στο γονιδιακό σύμπλεγμα YCNAW - tRNA. Τα γονίδια tRNA φαίνονται ως σκιασμένες περιοχές. Τα γονίδια tRNA, που κωδικοποιούνται από την αλυσίδα L, είναι γραμμένα εξωτερικά του κύκλου, ενώ αυτά που κωδικοποιούνται από την αλυσίδα Η είναι γραμμένα στο εσωτερικό. Η διάταξη αυτή είναι η “κοινής αποδοχής” διάταξη γονιδίων στα σπονδυλωτά που έχει επιβεβαιωθεί και στα ψάρια από τους Johansen *et al* (1990) και Meyer (1993).

Στα σπονδυλωτά, οι δύο αλυσίδες mtDNA γνωστές ως L (light-ελαφριά), και H (heavy-βαριά), παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στο περιεχόμενο G+T. Με λίγες εξαιρέσεις, όλα τα γονίδια στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα των σπονδυλωτών κωδικοποιούνται από την αλυσίδα H. Ετσι από τα 37 γονίδια στο mtDNA των σπονδυλωτών μόνο ο τύπος tRNA και το γονίδιο ND 6 κωδικοποιούνται από την αλυσίδα L.

Δεν συμβαίνει όμως το ίδιο και στα ασπόνδυλα. Ενώ στα σπονδυλωτά λιγότερο από 10% του ολικού αριθμού των βάσεων που κωδικοποιούν στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα βρίσκονται στην αλυσίδα L, στη *Drosophila* (Meyer,1993), το 50% περίπου βρίσκεται σε αυτή.

Η διάταξη των γονιδίων στο ζωικό mtDNA, τουλάχιστον μέσα σε μία ταξινομική τάξη ή φύλο, είναι εξαιρετικά σταθερή (Wilson *et al*, 1985). Ωστόσο, μπορεί να υπάρξει ποικιλότητα στη σειρά των γονιδίων του mtDNA, ακόμα και μέσα στο ίδιο φύλο. Στα ψάρια, η διάταξη των γονιδίων στο mtDNA τους δεν διαφέρει από τη διάταξη των γονιδίων των σπονδυλωτών (Johansen *et al*, 1990). Η σταθερότητα της διάταξης των γονιδίων στα ασπόνδυλα, όπως και η απουσία ιντρονίων και μεγάλων μεσογονιδιακών διαστημάτων, που κάνουν το γονιδίωμα του μιτοχονδρίου να εμφανίζεται σταθερό σε μεγάλης έκτασης αναδιατάξεις, οφείλονται στη συμπαγή δομή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (Brown, 1985).

Τα περισσότερα σωματικά κύτταρα (και τα ώριμα ωοκύτταρα) περιέχουν 100άδες ή 1000άδες μόρια mtDNA, έτσι ώστε μία καινούργια μετάλλαξη θα προσθέσει ή θα δημιουργήσει μία κατάσταση ετεροπλασμίας κατά την οποία δύο ή περισσότεροι γενότυποι θα συνυπάρχουν στο ίδιο άτομο. Αρχικά υπήρξε ο φόβος περιπτώσεων ετεροπλασμίας και πολυπλοκότητας της μελέτης του mtDNA, αλλά μόνο θεωρητικά. Στην πράξη, κάθε μιτοχόνδριο περιέχει μόνο ένα τύπο mtDNA (ομοπλασμία). Περιπτώσεις ετεροπλασμίας έχουν διαπιστωθεί σε διάφορες ομάδες οργανισμών, αλλά είναι σπάνιες και έτσι έχουν μικρή σημασία σε μελέτες του ζωικού mtDNA (Awise *et al*, 1987).

Ο μιτοχονδριακός γενετικός κώδικας είναι εκφυλισμένος και λιγότερο αυστηρός από τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα. Υπάρχουν επίσης μικρές διαφορές στους γενετικούς κώδικες μεταξύ σπονδυλωτών, εχινοδέρμων και *Drosophila* (Meyer, 1993). Ο ρυθμός εξέλιξης του mtDNA σε σχέση με αυτόν του μοναδικού πυρηνικού DNA (scnDNA) ποικίλει ανάμεσα στις διάφορες ομάδες οργανισμών. Το mtDNA εξελίσσεται 5-10 φορές ταχύτερα από το πυρηνικό DNA στα θηλαστικά, ενώ

αντιθέτως mtDNA και nDNA έχουν παρόμοιους ρυθμούς εξέλιξης σε πολλά έντομα (Meyer *et al*, 1987). Τα κύρια χαρακτηριστικά του υψηλού ρυθμού εξέλιξης του mtDNA των σπονδυλωτών είναι

1. Το εξαιρετικά υψηλό ποσοστό (>90%) σιωπηλών αντικαταστάσεων,
2. Ο υψηλός λόγος μετατοπίσεων/μεταστροφών (ts/tv) και
3. Η έντονη τάση για μεταπτώσεις C<->T στην αλυσίδα L (Gray, 1989).

Έχει βρεθεί ότι ο λόγος μεταπτώσεων προς μεταστροφές μικραίνει όσο ο χρόνος απόκλισης των προς σύγκριση ειδών αυξάνει, πιθανόν ως αποτέλεσμα πολλαπλών αντικαταστάσεων στην ίδια θέση (Wilson *et al*, 1985).

Ο ταχύτερος ρυθμός εξέλιξης του mtDNA εξηγείται από τους Wilson *et al* (1985) ως εξής:

α. Η πολυμεράση του mtDNA (πολυμεράση γ) δεν έχει ικανότητες επιδιόρθωσης ή το σύστημα επιδιόρθωσης έχει περισσότερη «ελευθερία λαθών», επειδή δεν κωδικοποιεί για πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφραση του mtDNA.

β. Η έλλειψη μηχανισμού ανασυνδυασμού, μέσω του οποίου η φυσική επιλογή θα μπορούσε να εξαλείψει τις ελαφρά βλαβερές μεταλλάξεις.

γ. Ο ταχύς ρυθμός εξέλιξης του mtDNA σε σχέση με το nDNA οφείλεται μόνο σε σιωπηρές μεταλλάξεις και οι αντικαταστάσεις αμινοξέων συσσωρεύονται στο μιτοχονδριακό και το πυρηνικό γονιδίωμα με παρόμοιους ρυθμούς (Brown & Simpson, 1982). Έτσι, η χαλαρή αναγνώριση κωδικονίων από τα αντικωδικόνια, το γεγονός ότι τα 4 νουκλεοτίδια είναι συχνά το ίδιο ανεκτά στην τρίτη θέση των κωδικονίων και αναγνωρίζονται από το ίδιο είδος tRNA και ότι οι μεταλλάξεις σε αυτές τις τρίτες θέσεις είναι πραγματικά σιωπηρές μπορεί να θεωρηθεί ένα είδος χαλαρής αυστηρότητας εναντίον αυτών των μεταλλάξεων. Αντιθέτως, οι διαφορές που παρατηρούνται στο ρυθμό εξέλιξης του mtDNA και του μοναδικού πυρηνικού DNA στα σπονδυλωτά πιθανόν να οφείλεται σε καθυστέρηση μάλλον της εξέλιξης του scnDNA παρά στον ταχύ ρυθμό εξέλιξης του mtDNA. Η τελευταία αυτή πιθανότητα δίνει μία άλλη διάσταση στο θέμα (Moritz *et al*, 1987).

## 2. Ερευνες της ποικιλότητας του mtDNA

Το mtDNA είναι ένα από τα περισσότερο και καλύτερα μελετημένα τμήματα του ζωικού γονιδιώματος. Και αυτό χάρη στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του σε σχέση με το nDNA, τα οποία προσφέρουν αρκετά πλεονεκτήματα στις πληθυσμιακές



μελέτες. Το γεγονός ότι το δραστικό μέγεθος πληθυσμού του mtDNA (υποθέτοντας ίση αναλογία φύλων) είναι το 1/4 σε σύγκριση με το nDNA (Birky *et al*, 1983), έχει ως αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη γενετική διαφοροποίηση εξαιτίας των φαινομένων της γενετικής παρέκλισης και έτσι το καθιστά πιο ικανό στην αποκάλυψη ειδικών πληθυσμιακών δεικτών. Από φυλογενετική σκοπιά, η έλλειψη ανασυνδυασμού σημαίνει ότι οι δείκτες του mtDNA μπορεί να χρησιμοποιηθούν στο να διερευνηθεί εάν τα άτομα των πληθυσμών είναι οργανωμένα σε μητριαρχικές σειρές. Οι λόγοι αυτοί καθιέρωσαν το mtDNA ως το δημοφιλέστερο γενετικό υλικό για τη μελέτη της δομής των πληθυσμών, της γονιδιακής ροής, των ζωνών υβριδισμού, της βιογεωγραφίας και των φυλογενετικών σχέσεων σε ενδοειδικό και διαειδικό επίπεδο (Moritz *et al*, 1987).

Ο κύριος τρόπος ανίχνευσης της ποικιλομορφίας του mtDNA σε φυσικούς πληθυσμούς είναι οι συγκρίσεις των περιοριστικών προτύπων και μοριακών χαρτών που προκύπτουν από την πέψη του mtDNA με ένζυμα περιορισμού (Avisé, 1994). Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού οι οποίες αναγνωρίζουν μία συγκεκριμένη μικρή νουκλεοτιδική αλληλουχία (συνήθως 4-6 βάσεις) κόβουν το δίκλωνο mtDNA στις ειδικές θέσεις αναγνώρισης, δημιουργώντας έτσι έναν αριθμό θραυσμάτων. Ο αριθμός και το μέγεθος των θραυσμάτων διαφέρει και εξαρτάται από τις θέσεις στις οποίες βρίσκεται η αλληλουχία αναγνώρισης στο μόριο του mtDNA. Έτσι, οι διαφορές στα πρότυπα των θραυσμάτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες γενετικά διακριτών σειρών. Ο προσδιορισμός του πολυμορφισμού μήκους που προκύπτει από τα διαφορετικά θραύσματα του mtDNA που αποκαλύπτονται, μετά από πέψεις με ένζυμα περιορισμού (RFLPs), μας δίνει μία εκτίμηση του επιπέδου της διαφοροποίησης της αλληλουχίας.

Οι πρώτες έρευνες της ποικιλότητας του mtDNA απαιτούσαν μεγάλες ποσότητες ιστού και χρησιμοποιούσαν χρονοβόρα πρωτόκολλα, ενώ ο αριθμός των ατόμων που εξετάζονταν ήταν περιορισμένος και συχνά ανεπαρκής για αξιόπιστες πληθυσμιακές μελέτες. Η χρησιμοποίηση κατάλληλων ανιχνευτών του mtDNA και πρόσφατα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), η οποία επιτρέπει την ενίσχυση επιλεγμένων περιοχών του DNA, έκανε την εξέταση της ποικιλότητας του mtDNA σημαντικά ευκολότερη και γρηγορότερη.

Σήμερα υπάρχουν διαθέσιμοι αρκετοί «παγκόσμιοι» εκκινητές οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ικανοποιητικά για την ενίσχυση διαφόρων περιοχών του mtDNA (Kocher *et al*, 1989, Cronin *et al*, 1993). Τα ενισχυμένα αυτά τμήματα του

DNA μπορούν στη συνέχεια να μελετηθούν με τη βοήθεια των ενζύμων περιορισμού και την ανάλυση των RFLPs, είτε με την εύρεση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας τους, (Sequencing = Ανάλυση πρωτοδιάταξης του μορίου του DNA).

Επειδή όμως διαφορετικές περιοχές του μιτοχονδριακού γονιδιώματος εξελίσσονται με διαφορετικούς ρυθμούς, η επιλογή των τμημάτων που θα ενισχυθούν με τη βοήθεια της PCR έχει μεγάλη σημασία. Η περιοχή ελέγχου, η οποία εμφανίζει μεγάλη ποικιλότητα στα θηλαστικά (εάν και δεν υπάρχουν διαθέσιμα πολλά στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι ισχύει το ίδιο και στα ψάρια), αποτέλεσε το στόχο πολλών πληθυσμιακών μελετών. Επίσης, οι περιοχές των γονιδίων του κυτοχρώματος b και της NADH αφυδρογονάσης έχουν μελετηθεί σε ένα μεγάλο αριθμό ειδών καθώς έχει αναφερθεί ότι εμφανίζουν ποικιλότητα σε πληθυσμιακό επίπεδο. Αντίθετα, τα γονίδια του ριβοσωμικού mtDNA, τα οποία εξελίσσονται πιο αργά, έχουν χρησιμοποιηθεί για φυλογενετικές μελέτες μεταξύ διαφορετικών ειδών ή οικογενειών.

### **3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της ανάλυσης DNA (mtDNA - nDNA)** **(Πίνακας 1)**

#### ***Πλεονεκτήματα***

1. Μόνο ένας ιστός και σε μικρή σχετικά ποσότητα είναι αρκετός.
2. Το υλικό διατηρείται και αποθηκεύεται πιο εύκολα.
3. Αρκετοί γονιδιακοί τόποι έχουν περισσότερα αλληλόμορφα από αυτά που αποκαλύπτονται με την ενζυμική ανάλυση.
4. Ορισμένοι γονιδιακοί τόποι δεν κωδικοποιούν για πρωτείνες και ως εκ τούτου ενδέχεται να μην υπόκεινται στην δράση της επιλογής.
5. Μεταλλάξεις που δεν έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πρωτεϊνών είναι ανιχνεύσιμες.
6. Πληθώρα από πιθανούς γενετικούς δείκτες μπορεί να μελετηθεί.
7. Δεν απαιτείται πάντοτε θάνατος των ατόμων.

#### ***Μειονεκτήματα***

1. Η εφαρμογή της μεθόδου έχει υψηλό κόστος.
2. Η εκμάθηση των μοριακών τεχνικών είναι δύσκολη.
3. Στη βιβλιογραφία είναι διαθέσιμος μικρός αριθμός συγκριτικών πληροφοριών.



**Πίνακας 1.** Σύγκριση των πλεονεκτημάτων και των μειονεκτημάτων της ανάλυσης των ισοενζύμων και του DNA.

Ισοενζυμική ανάλυση	
Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Η ανάλυση των δειγμάτων είναι γρήγορη.</li> <li>• Σχετικά χαμηλό κόστος χημικών.</li> <li>• Η εκμίσθωση τεχνικών είναι εύκολη.</li> <li>• Αναλύονται πρωτεΐνες με γνωστή λειτουργία</li> <li>• Πληθώρα απαιτήσεων για πολλά είδη υπέρχουν στη βιβλιογραφία</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Απαιτείται συλλογή και αποθήκευση των ιστών (απαιτούνται νεοπά ή καταψυγμένα δείγματα).</li> <li>• Απαιτείται η συλλογή πολλών ιστών και σε μεγάλες σχετικές ποσότητες με αποτέλεσμα να χρειάζεται να θανατωθούν τα άτομα.</li> <li>• Συνήθως ανιχνεύεται μικρός αριθμός αλληλομόρφων για κάθε γονιδιακό τόπο</li> <li>• Μπορεί να μη ληφθούν μόνο πρωτεΐνες, που χρησιμοποιούνται με χημικούς χρωματισμούς.</li> <li>• Ορισμένοι γονιδιακοί τόποι υπόκεινται στη δράση της φυσικής επιλογής.</li> <li>• Η ανάλυση των προτύπων μπορεί να είναι δυσεπής ειδικά σε περιπτώσεις πολυπλοκότητας.</li> <li>• Οι δυνατότητες της μεθοδολογίας είναι περιορισμένες (μικρό εύρος δυνατότητων).</li> </ul>
Ανάλυση του DNA	
Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Μόνο ένας ιστός ή αίμα και σε μικρή σχετικά ποσότητα είναι αρκετός.</li> <li>• Η ενίσχυση με την αλυσωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) ελαχιστοποιεί τις ποσότητες ιστών που απαιτούνται και επιτρέπει την εξέταση λεπτών καθώα και μισοσελακών δειγμάτων.</li> <li>• Το υλικό διατηρείται και αποθηκεύεται πιο εύκολα.</li> <li>• Αρκετοί γονιδιακοί τόποι έχουν περισσότερα αλληλόμορφα από αυτά που αποκαλύπτονται με την ενζυμική ανάλυση</li> <li>• Ορισμένοι γονιδιακοί τόποι δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες και ως εκ τούτου ενδέχεται να μην υπόκεινται στη δράση της επιλογής.</li> <li>• Μεταλλάξεις που δεν έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πρωτεϊνών είναι ανιχνεύσιμες.</li> <li>• Πληθώρα από πιθανούς γενετικούς δείκτες μπορεί να μελετηθεί.</li> <li>• Δεν απαιτείται πάντοτε ο θάνατος των ατόμων.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Η εφαρμογή της μεθοδολογίας αυτής είναι σχετικά αργή και συνεπάγεται υψηλό κόστος.</li> <li>• Η εκμίσθωση των μοριακών τεχνικών είναι δυσκολότερη.</li> <li>• Στη βιβλιογραφία είναι διαθέσιμος μικρός αριθμός συγκριτικών πληροφοριών.</li> </ul>

## Δ. Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

### 1. Η τεχνική της PCR

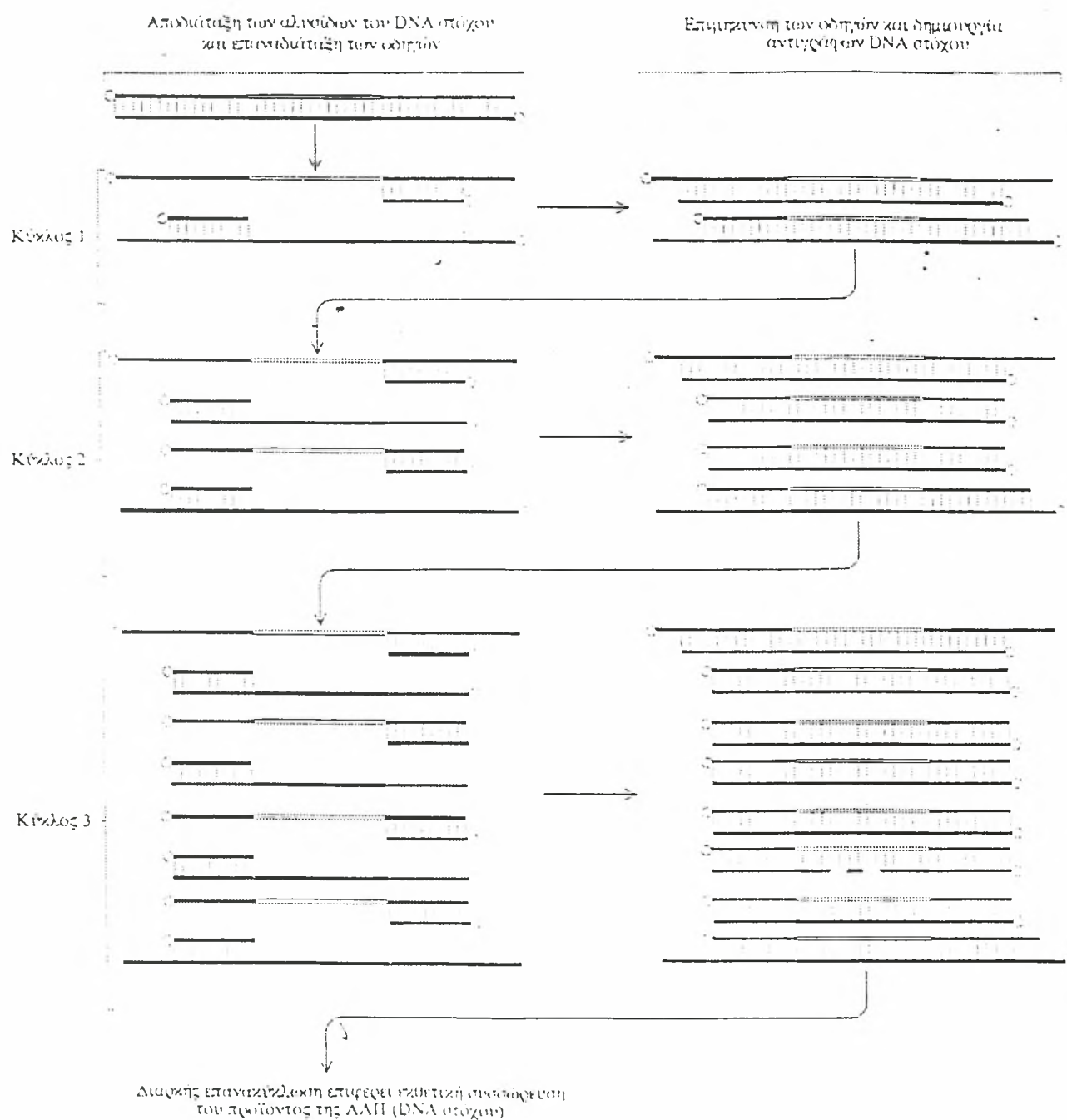
Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, Polymerase Chain Reaction (PCR), επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA (DNA-στόχου) από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος (Saiki *et al*, 1988). Στηρίζεται στην κινητική επανασύνδεσης θερμικά αποδιαταγμένου δίκλωνου DNA και κυρίως στην αρχή ότι ο χρόνος επανασύνδεσης εξαρτάται από την συγκέντρωση και την πολυπλοκότητα των συμβαλλόμενων συμπληρωματικών αλυσίδων (Britten & Kohne, τέλη 1960). Έτσι από αρχική ποσότητα δείγματος DNA μη ανιχνεύσιμου με κλασσικές τεχνικές υβριδισμού (Southern & Northern blotting), το DNA ενισχύεται με την PCR ώστε να γίνεται εύκολα ανιχνεύσιμο.

Το 1993 ο Dr K. Mullis τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Χημείας για την καθοριστική συμβολή του στην ανάπτυξη της τεχνικής PCR.

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου στηρίζεται στη χρήση

- 1.Ειδικής DNA πολυμεράσης (Taq DNA polymerase) που έχει απομονωθεί από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι θερμοσταθερή διατηρώντας τη δραστηριότητά της σε θερμοκρασίες έως και 95°C
2. Ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (συνήθως 15 - 30 βάσεων) τα οποία ονομάζονται εκκινητικά μόρια ή οδηγοί (primers).
3. Κατάλληλου διαλύματος ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβοζονουκλεοτιδίων (dNTPs).
4. Κατάλληλης συγκέντρωσης διαλύματος  $MgCl_2$
5. Ειδικού διαλύματος για την Taq πολυμεράση
6. Μικρής ποσότητας DNA που παίζει το ρόλο του μορίου-μήτρας.

Η τεχνική της PCR πραγματοποιείται σε κύκλους (Εικ. 3). Κάθε κύκλος της PCR αποφέρει εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA στόχου. Κάθε κύκλος της PCR πραγματοποιείται σε στάδια-φάσεις. Το πρώτο στάδιο της PCR είναι η θερμική αποδιάταξη του DNA-στόχου, όπου το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Έπεται το δεύτερο στάδιο της θερμικής επαναδιάταξης του DNA, οπότε τα δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια συνδέονται με τις δύο συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA-στόχου, δηλαδή τις απλές αλυσίδες DNA. Κατά το τρίτο στάδιο λαμβάνει χώρα η σύνθεση DNA (πολυμερισμός) με το διπλασιασμό του DNA-στόχου παρουσία θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης και τριφωσφορικών



**Εικόνα 3.** Σχηματική αναπαράσταση μιας πλήρους σειράς κύκλων της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης.

δεοξυριβοζονουκλεοτιδίων, οπότε οι συμπληρωματικές βάσεις προστίθενται στα 3' άκρα των εκκινητικών μορίων και οι πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες επεκτείνονται. Η σύνθεση DNA γίνεται πάντοτε προς την κατεύθυνση 5'→3'. Το σύνολο των τριών φάσεων, α. μετουσίωσης-αποδιάταξης (denaturation), β. υβριδισμού-πρόσδεσης των εκκινητών επί των συμπληρωματικών τους αλληλουχιών στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA-στόχου (annealing) και γ. επέκτασης (extension) -σύνθεσης, πολυμερισμού (polymerisation) των προσδεδεμένων εκκινητών αποτελεί ένα κύκλο της αντίδρασης PCR. Στο τέλος της διαδικασίας, από μία δίκλωνη γονική έλικα DNA δημιουργούνται δύο θυγατρικές δίκλωνες έλικες DNA, στον αμέσως επόμενο κύκλο οι δίκλωνες έλικες DNA γίνονται 4 (δύο του αρχικού υποστρώματος και δύο αντίγραφα) που αποτελούν πρότυπα καλούπια για τη σύνθεση νέων κλώνων DNA-στόχου στον επόμενο κύκλο. Σε κάθε νέο κύκλο οι κλώνοι θα αυξάνονται με εκθετική πορεία κατά  $2^n$  όπου η ο αριθμός των κύκλων αντίδρασης. Ο πολλαπλασιασμός συνεχίζεται για 25-40 κύκλους. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο πολλαπλασιασμός του τμήματος DNA-στόχου εκατομμύρια φορές σε λίγες ώρες. Μάλιστα, εάν υποθέσουμε ότι η απόδοση του συστήματος είναι 100% για κάθε κύκλο, τότε μετά από 25 κύκλους έχουμε την παραγωγή  $2^{25}$  (33.554.432) αντιγράφων, ενώ μετά από 40 κύκλους έχουμε την παραγωγή  $2^{40}$  (1.099.511.627.716) μονόκλωνων συμπληρωματικών αντιγράφων DNA-στόχου (Πίνακας 2).

Ο άριστος αριθμός κύκλων εξαρτάται από την συγκέντρωση του DNA-στόχου και την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο. Μεγαλύτερος αριθμός κύκλων από τον ιδανικό, συνεπάγεται αύξηση των μη ειδικών προϊόντων της γονιδιακής επέκτασης, ενώ μικρότερος αριθμός αποδίδει χαμηλότερο αριθμό αντιγράφων με αποτέλεσμα τη δυσχερή έως αδύνατη ανίχνευση του DNA-στόχου. Ας σημειωθεί ότι όταν ο αριθμός των μορίων του στόχου σε ένα βιολογικό υλικό είναι  $10^5$  απαιτούνται 30 κύκλοι ενώ όταν είναι  $10^4$  απαιτούνται 35 κύκλοι ενώ όταν είναι  $10^3$  ή μικρότερος απαιτούνται 40-45 κύκλοι.

Το κύριο προϊόν της PCR είναι δίκλωνο DNA, τα 5' άκρα του οποίου καθορίζονται από τους εκκινητές. Το μέγεθος του προϊόντος της PCR, σε ζεύγη βάσεων ισούται με το άθροισμα των βάσεων του ζεύγους των εκκινητών και της παρεμβαλλόμενης αλληλουχίας του DNA-στόχου που επεκτείνεται.

Πίνακας 2. Ενίσχυση του DNA στόχου μέσω της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης.

Αριθμός κύκλων ΑΑΠ	Αριθμός μονόκλωνων αντιγραφών DNA στόχου
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1.024
11	2.048
12	4.096
13	8.192
14	16.384
15	32.768
16	65.536
17	131.072
18	262.144
19	524.288
20	1.048.576
21	2.097.152
22	4.194.304
23	8.388.608
24	16.777.216
25	33.554.432
26	67.108.864
27	134.217.728
28	268.435.456
29	536.870.912
30	1.073.741.824
31	2.147.483.648
32	4.294.967.296
33	8.589.934.592
34	17.179.869.184
35	34.359.738.368
36	68.719.476.736
37	137.438.953.472
38	274.877.906.944
39	549.755.813.888
40	1.099.511.627.776



Κάθε κύκλος της PCR περιλαμβάνει τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες για τα τρία στάδια αποδιάταξης, υβριδισμού, πολυμερισμού. Η αποδιάταξη του DNA πραγματοποιείται συνήθως σε θερμοκρασίες 92-95°C για 30 sec, ο υβριδισμός στους 50-65°C για 1-2 λεπτά ανάλογα με την περιεκτικότητα των οδηγών σε A/T, G/C και ο πολυμερισμός στους 70-78°C για 1-2 λεπτά. Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας επιτυγχάνονται με τη χρήση ειδικών αυτοματοποιημένων συσκευών, των θερμικών ανακυκλωτών ή θερμοκυκλοποιητών και είναι ταχύτατες, ώστε αυξομειώσεις της τάξεως των 40°C λαμβάνουν χώρα σε λιγότερο από ένα λεπτό.

Για την επέκταση του DNA-στόχου απαιτούνται 100 ng ολικού DNA. Η αλληλουχία του DNA-στόχου πρέπει να είναι ακέραια για να επιτευχθεί η αντιγραφή της. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του DNA-στόχου μπορεί να είναι άγνωστη, αρκεί να είναι γνωστές οι αλληλουχίες των δύο άκρων του DNA-στόχου ώστε να σχεδιασθούν τα απαραίτητα για τη μέθοδο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές.

Ο σχεδιασμός και η επιλογή των κατάλληλων εκκινητών γίνεται σύμφωνα με τις σταθερές περιοχές του DNA-στόχου. Οι οδηγοί πρέπει να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε G/C, να μην εμφανίζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή το 5' άκρο τους, να απέχουν μεταξύ τους κατά 50 ζεύγη βάσεων και να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία τήξεως (melting temperature,  $T_m$ ). Η θερμοκρασία τήξεως δίκλωνου DNA είναι συνάρτηση της αλληλουχίας του μορίου και κατά προσέγγιση υπολογίζεται με βάση την περιεκτικότητα του μορίου σε πουρίνες και πυριμιδίνες ως εξής

$T_m = (4 \times \text{αριθμός βάσεων G+C}) + (2 \times \text{αριθμός βάσεων A+T})$ .

Επιθυμητές  $T_m$  κυμαίνονται μεταξύ 55-65°C. Μεγάλο ρόλο στην τεχνική PCR παίζει και η θερμοκρασία επαναδιάταξης  $T_a$  (annealing temperature) των εκκινητικών μορίων. Η  $T_a$  είναι κατά κανόνα 5-10°C χαμηλότερη της  $T_m$ . Η παρασκευή των συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων γίνεται σε αυτόματες συσκευές σύνθεσης DNA.

Ας σημειωθεί ότι η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων, που προστίθενται στο 3' άκρο της μίας αφετηρίας στην αρχή δεν σταματά υποχρεωτικά στην επιθυμητή 5' θέση του άλλου ολιγονουκλεοτιδίου, αλλά προχωρεί άλλοτε λίγο και άλλοτε περισσότερο. Ωστόσο μετά από μερικούς κύκλους αντίδρασης επικρατούν οι θυγατρικές αλυσίδες που έχουν ως άκρα τους τα προκαθορισμένα σημεία της επιθυμητής αλληλουχίας. Είναι δυνατόν κατά τους πρώτους κύκλους της PCR να σχηματισθούν αλυσίδες DNA μακρύτερες από το τελικό μήκος του DNA-στόχου, οι οποίες όμως αποτελούν ελάχιστο ποσοστό του προϊόντος της PCR και συνεπώς δεν είναι ανιχνεύσιμες.

## 2. Χαρακτηριστικά της τεχνικής PCR

Η επιτυχία της τεχνικής PCR εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία υβριδισμού  $T_a$ , η οποία εξαρτάται από την ειδική σύνδεση των εκκινητικών μορίων με το DNA-στόχο. Μικρότερη θερμοκρασιακή διαφορά ανάμεσα στις  $T_a$  και  $T_m$  συνεπάγεται μεγαλύτερη επιτυχία της αντίδρασης. Η συγκέντρωση των ιόντων  $Mg$ , ο αριθμός των κύκλων, η συγκέντρωση της  $Taq$  πολυμεράσης αλλά και η συγκέντρωση των εκκινητών και του DNA-στόχου συμβάλλουν στο αποτέλεσμα της αντίδρασης.

Η ενίσχυση του επιθυμητού προϊόντος της αντίδρασης πιστοποιείται με την παρουσία ομοιογενούς προϊόντος αναμενόμενου μεγέθους σε ηλεκτροφόρηση αгарόζης, παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου ( $1\mu g/ml$ ). Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ διαδοχικών βάσεων της διπλής έλικας και διευκολύνει την ανίχνευση του προϊόντος της PCR σε περιβάλλον υπεριώδους φωτισμού. Η ταυτοποίηση του προϊόντος της PCR γίνεται συνήθως με υβριδισμό με γνωστό ανιχνευτή (probe), σημασμένο με  $^{32}P$  ή βιοτίνη ή φλουορεσκίνη ή αλκαλική φωσφατάση ή υπεροξειδάση ή κάποια άλλη εύκολα ανιχνεύσιμη ουσία. Εναλλακτικά, η ταυτότητα του προϊόντος της γονιδιακής επέκτασης μπορεί να εξακριβωθεί και με ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων διάσπασης από κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα.

Η ευαισθησία της τεχνικής PCR είναι μεγάλη. Με ραδιενεργό σήμανση του μορίου ανιχνευτή/probe είναι δυνατή η ανίχνευση έως  $1\text{ pg}$  DNA. Με την τεχνική της επανεντοπισμένης PCR (nested PCR) η ευαισθησία αυξάνεται στο  $1\text{ fg}$ . Στην τεχνική αυτή  $1\text{--}2\text{ }\mu l$  του προϊόντος της PCR, υποβάλλονται σε  $2^{\eta}$  PCR με νέο ζεύγος εκκινητικών μορίων, εσωτερικό των αρχικών (inner primers), ώστε όταν η πρώτη PCR γίνει για 25 κύκλους και το προϊόν της υποβληθεί σε επανεντοπισμένη PCR για 25 ακόμα κύκλους, να παράγονται  $1,1 \times 10^{15}$  αντίγραφα DNA στόχου. Θεωρητικά, η επανεντοπισμένη PCR έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύσει 1 αντίγραφο προϊόντος HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus) σε  $1 \times 10^6$  κύτταρα.

Μεγάλη είναι η ευαισθησία της τεχνικής PCR και στις μολύνσεις. Πιθανή επιμόλυνση της PCR μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Η επιμόλυνση μπορεί να προκληθεί από αιωρούμενο DNA στον εργαστηριακό χώρο. Προς αποφυγή των επιμολύνσεων η προετοιμασία των χώρων εκτέλεσης της τεχνικής πρέπει να είναι σχολαστική. Για τη μείωση των πιθανοτήτων επιμολύνσεων συνιστάται α) χρήση διαφορετικών χώρων επεξεργασίας των δειγμάτων και διεξαγωγής των αντιδράσεων, κυρίως σε περιπτώσεις διαδοχικών PCR, β)



χρησιμοποίηση διαφορετικών συσκευών καθέτου νηματικής ροής (laminar flow hood) για την απομόνωση του DNA και την προετοιμασία των αντιδραστηρίων, γ) αποστείρωση αντιδραστηρίων και σωληναρίων, προσεκτικός καθαρισμός πιπετών με αιθανόλη και έκθεση του χώρου ή των χώρων εργασίας σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) μετά το τέλος της εργασίας για 12 τουλάχιστον ώρες. Για μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται πολλοί μάρτυρες και να μην αξιολογείται ένα δείγμα σαν θετικό εάν δεν επαληθευθεί και επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα 2 φορές τουλάχιστον κατά προτίμηση με 2 διαφορετικά ζεύγη οδηγών.

Ιδιαίτερης σημασίας είναι η επιλογή του προς επέκταση στόχου, όπως και ο σχεδιασμός των κατάλληλων εκκινητών και ανιχνευτών κυρίως σε περιπτώσεις ανίχνευσης ποικιλιών ιών όπως ο HIV ή γονιδιακών περιοχών εντόνων ανακατανομών και μεταλλαξιμότητας, όπως διαφόρων εύθραυστων αυτοσωμικών περιοχών, των ψευδοσωματικών περιοχών του Υ χρωμοσώματος κ.α. Σε περίπτωση θετικών δειγμάτων, όταν χρησιμοποιούνται περισσότερα από τέσσερα διαφορετικά ζεύγη εκκινητικών μορίων, όπως συνηθίζεται για την επέκταση διαφορετικών γονιδιακών περιοχών, τότε η ευαισθησία και η αποτελεσματικότητα της μεθόδου είναι δυνατόν να υπερβεί το 97%.

### 3. Πλεονεκτήματα και σημασία της τεχνικής PCR

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι γρήγορη, απλή, απαιτεί ελάχιστες ποσότητες ιστού και όχι τη θανάτωση του ζώου. Ετσι, λέπια από ζωντανό ψάρι παρέχουν αρκετή ποσότητα DNA ώστε δεν είναι απαραίτητο να θανατωθεί το ψάρι για τις αναλύσεις μιτοχονδριακού και πυρηνικού DNA. Η τεχνική της PCR έχει τη δυνατότητα εφαρμογής σε DNA το οποίο εξάγεται από στεγνό ιστό προσκολλημένο σε ιστορικές συλλογές ωτολίθων, καθιστώντας έτσι δυνατό τον προσδιορισμό γενετικών δεσμών από πληθυσμούς του παρελθόντος.

Η σημασία της μεθόδου είναι τεράστια και το φάσμα εφαρμογών της τεράστιο (Βιοιατρική, Βιοτεχνολογία, Βιολογικός έλεγχος περιβάλλοντος). Η διεθνοποίηση του όρου PCR σε σχεδόν ισότιμο των όρων DNA, RNA έρχεται να επιβεβαιώσει τη σημασία της τεχνικής αυτής.

## Ε. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

### 1. Σκοπός της εργασίας

Η εργασία αυτή αποτελεί μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων τεσσάρων ειδών της οικογένειας Mullidae. Ειδικότερα

- Τη μελέτη της γενετικής δομής των τεσσάρων ειδών με τη χρησιμοποίηση 12 ενζυμικών συστημάτων που αντιπροσωπεύουν 18 γονιδιακούς τόπους.
- Την εκτίμηση του βαθμού διαφοροποίησης στο επίπεδο του μιτοχονδριακού DNA, όπως αυτός αποκαλύπτεται με την ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων του και τη χρησιμοποίηση ενζύμων περιορισμού σε τυχαίως επιλεγμένα άτομα των τεσσάρων ειδών.
- Την εύρεση κατάλληλων γενετικών δεικτών που θα επιτρέψουν την ταυτοποίηση των ειδών.
- Τη μελέτη των γενετικών σχέσεων ανάμεσα στα είδη.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### A. Βιολογικό υλικό

Το υλικό που μελετήθηκε ήταν είδη της οικογένειας Mullidae. Στην οικογένεια αυτή περιλαμβάνονται ψάρια εξαιρετικής γευστικότητας που έχαιραν μεγάλης εκτίμησης από τους αρχαίους Έλληνες και τους Ρωμαίους. Το κρέας τους είναι άσπρο, συνεκτικό, εύγευστο και περιζήτητο.

Τα ψάρια της οικογένειας αυτής ζουν σε μεγάλα κοπάδια, κοντά στις ακτές κατά την αναπαραγωγική περίοδο. Τον άλλο καιρό παραμένουν κοντά στο βυθό, χρησιμοποιώντας τα γένια τους για την εύρεση της τροφής. Έχουν χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα που οφείλεται σε ερεθισμούς ή διαπιστώνεται μετά το θάνατο του ψαριού. Στο φυσικό τους περιβάλλον, ζωντανά είναι συνήθως καφέ, πρασινωπά στη ράχη και ασημί στην κοιλιά. Τα λέπια τους είναι μεγάλα, ελαφρώς κτενοειδή και αποσπώνται με μεγάλη ευκολία. Η πλάγια γραμμή είναι ευδιάκριτη. Τα ραχιαία πτερύγια είναι δύο, χωρισμένα το ένα από το άλλο. Τα κοιλιακά πτερύγια είναι μεγάλα, το ουραίο διχλωτό. Το σώμα τους είναι πιεσμένο επίμηκες. Το στόμα τους μικρό, ελαφρά σωληνωτό, με μικρά δόντια στην κάτω σιαγόνα (η επάνω σιαγόνα δεν έχει δόντια).

Η οικογένεια Mullidae περιλαμβάνει 15 γένη, από τα οποία τα δύο απαντούν στη Μεσόγειο (τα *Mullus* και *Upeneus*). Ψαρεύονται με μηχανότραπεζες, δίχτυα και μερικές φορές με αγκίστρια.

Η συστηματική κατάταξη για την οικογένεια και τα τέσσερα είδη έχει ως εξής

Κλάση Osteichthyes

Μεσοκλάση Teleostei

Υπερτάξη Acanthopterygii

Τάξη Perciformes

Υποτάξη Percoides

Οικογένεια Mullidae

Είδος 1. *Mullus surmuletus*, (μπαρμπούνι)

Είδος 2. *Mullus barbatus*, (κουτσομούρα)

Είδος 3. *Upeneus moluccensis*, (λοχίας)

Είδος 4. *Pseudopeneus prayensis*, (μπαρμπούνι της Ανατολής)

## 1. Μπαρμπούνι

Είναι βενθικό, κοπαδιάρικο ψάρι, πέτρινων βυθών αλλά και αμμουδιών έως 100 μέτρα βάθος. Τα μεγαλύτερα σε ηλικία άτομα ζουν σε βαθύτερα στρώματα 200-300 μέτρων. Το μπαρμπούνι είναι λιγότερο μεταναστευτικό από την κουτσομούρα. Η αναπαραγωγική του περίοδος αρχίζει το Μάιο και τελειώνει τον Ιούλιο. Τα αυγά και οι προνύμφες του είναι πελαγικά. Τις πρώτες μέρες της ζωής τους τα νεαρά ιχθύδια είναι πλαγκτονικά. Όταν το μήκος τους φτάσει τα 5 εκατοστά γίνονται βενθικά. Αναπαράγονται με την συμπλήρωση του 1ου ή 2ου έτους τους, οπότε έχουν μήκος 11-14 εκατοστά. Χρησιμοποιούν τα δύο γένια τους (αισθητήρια όργανα της αφής και της γεύσης) για να ψηλαφούν το βυθό, αναζητώντας τροφή. Τρέφονται με βενθικά ζώα (μαλακόστρακα, αμφίποδα, πολύχαιτους, μαλάκια, ψάρια). Ψηλαφώντας το βυθό εισχωρούν μέχρι και το 1/3 του σώματός τους, με γωνία 45 μοίρες.

Τα μπαρμπούνια βόσκουν πολλές ώρες και διακόπτουν τη δραστηριότητά τους μόνο όταν παραστεί κίνδυνος. Το ανασήκωμα του 1ου ραχιαίου πτερυγίου αποτελεί σήμα κινδύνου για ολόκληρο το κοπάδι που τρέχει να απομακρυνθεί. Τη νύχτα αναπαύονται στο βυθό. Ψαρεύονται με δίχτυα, τράτες και μηχανότραπεζες.

Γεωγραφικά συναντώνται στον Ατλαντικό, από τα Κανάρια μέχρι τη Νορβηγία, στη Μεσόγειο, στις Ελληνικές θάλασσες, στη Βαλτική και στη Β.Δ.Αφρική.

## 2. Κουτσομούρα

Έχει σώμα λίγο συμπιεσμένο. Μούρη κομμένη σχεδόν κάθετα (κουτσή μούρη). Είναι βενθικό ψάρι που ζει σε λάσπες και άμμο, σε βάθη 20-300 μέτρα των περιοχών της υφαλοκρηπίδας. Απαντά επίσης και σε χαλικώδεις και αμμώδεις βυθούς. Ζει και μετακινείται σε κοπάδια. Τρέφεται με βενθικά ασπόνδυλα ζώα (μαλακόστρακα, πολύχαιτους, σκουλήκια, μαλάκια), σκαλίζοντας το βυθό με τα γένια για την ανακάλυψη της τροφής. Η αναπαραγωγική του περίοδος είναι από τον Απρίλιο έως τον Αύγουστο. Οι προνύμφες ζουν πλαγκτονικά έως μήκος 28 χιλιοστά, γεγονός που συντελεί στη διασπορά των ατόμων και πιθανόν στην ομογενοποίηση διαφορετικών ιχθυοπληθυσμών.

Ψαρεύεται με τις μηχανότρατες σε λασπώδεις βυθούς και σε βάθη 25-50 οργυές. Δεν τσιμπά πάντοτε εύκολα το αγκίστρι της καθετής. Πιάνεται εύκολα με δίχτυα επειδή έχει την συνήθεια να ανεβαίνει με το παλιρροιακό κύμα για την αναζήτηση της τροφής της. Σε φουσκοθαλασσιά πιάνεται εύκολα απλώνοντας παράλληλα προς την ακρογυαλιά απλάδια ή και μανωμένα δίχτυα.

Συναντάται στον Ανατολικό ατλαντικό, από Μεγάλη Βρετανία έως Ντακάρ, στις Αζόρες, στα Κανάρια νησιά, στη Μεσόγειο, στις Ελληνικές θάλασσες.

## 3. Λοχίας

Έχει μούρη ομαλή, στρογγυλεμένη. Μία λαμπερή κίτρινη ταινία που ξεκινά από το μπροστινό προφίλ του κεφαλιού, περνά ανάμεσα από τα μάτια, πάνω από την πλάγια γραμμή και φθάνει μέχρι την ουρά. Η αναπαραγωγική του περίοδος ξεκινά τον Ιούνιο και τελειώνει τον Οκτώβρη. Είναι βενθικό ψάρι των παράκτιων τροπικών περιοχών σε βάθη από 10-80 μέτρα, όπου ο βυθός γίνεται λασπώδης. Απαντά σε μεγάλα κοπάδια. Τρέφεται με βενθικούς οργανισμούς (μαλάκια, πολύχαιτους). Ψαρεύεται με μηχανότρατες, τράτες, δίχτυα ή με αγκίστρι.

Συναντάται στις Ανατολικές ακτές της Μεσογείου, στις ακτές του Λιβάνου, στο Ισραήλ, στο Αιγαίο πέλαγος, στο κανάλι του Σουέζ, στις βόρειες ακτές της Αυστραλίας, στις περιοχές του Ινδικού και του Ειρηνικού ωκεανού, στη δυτική πλευρά της ανατολικής Αφρικής. Στη Μεσόγειο εισέβαλε μετά τη διάνοιξη της διώρυγας του Σουέζ (1869).

#### 4. Μπαρμπούνι Σενεγάλης.

Έχει σώμα ελαφρώς συμπιεσμένο. Το προφίλ του κεφαλιού δεν είναι πολύ κυρτό. Διαθέτει ένα ζεύγος από μουστάκια κάτω απ' το πηγούνι και γερά κωνικά δόντια, ορισμένα από τα οποία διακρίνονται και όταν το στόμα είναι κλειστό. Στο πρώτο πλευρικό πτερύγιο υπάρχουν οκτώ άκανθες με την πρώτη πολύ κοντή. Στο δεύτερο πλευρικό πτερύγιο υπάρχει μία άκανθα και οκτώ ακτίνες.

Έχει ρόδινο χρώμα με 3-4 κόκκινες γραμμές κατά μήκος του σώματος. Είναι βενθικό ψάρι και βρίσκεται σε αμμώδεις και λασπώδεις βυθούς σε βάθη 10-300 μέτρα (συνήθως όμως από 30 έως 50 μέτρα). Τρέφεται με βενθικούς οργανισμούς (μαλάκια και πολύχαιτους). Συναντάται στις Νότιες ακτές του Μαρόκου, από τις Δυτικές ακτές της Αφρικής μέχρι την Αγκόλα και συχνά Μαυριτανία. Πρόσφατα βρέθηκε στις Δυτικές ακτές της Μεσογείου (στις Νοτιοανατολικές ακτές της Ισπανίας).



## B. Μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν

### 1. Ισοενζυμική ανάλυση

-Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αμύλου

Η παρασκευή της πηκτής αμύλου σε οριζόντιες πλάκες γινόταν με τη χρησιμοποίηση υδρολυμένου αμύλου και του κατάλληλου για κάθε ένζυμο ρυθμιστικού διαλύματος. Η ποσότητα του αμύλου που χρησιμοποιήθηκε ήταν το 10% της ποσότητας του ρυθμιστικού διαλύματος.

Σε κωνική φιάλη αναμιγνύονταν 40 gr αμύλου και 400 ml ρυθμιστικού διαλύματος και στη συνέχεια θερμαίνονταν πάνω από φλόγα ώστε η φλόγα να περνάει από όλο τον πάτο και με συνεχή έντονη ανάδευση με το χέρι. Όταν το αιώρημα έφθανε σε σημείο βρασμού διακοπτόταν η θέρμανση και ακολουθούσε απαέρωση σε αντλία κενού για λιγότερο από 1 λεπτό. Έπειτα το περιεχόμενο αδειάζόταν σε πλαίσιο διαστάσεων 20X21X1 cm και αφού παρέμενε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά, αποθηκευόταν, σκεπασμένο με πλαστικό για να μη στεγνώσει, στο ψυγείο για τουλάχιστον 2 ώρες.

Πριν χρησιμοποιηθεί η πηκτή κόβονταν γύρω γύρω με μαχαίρι. Με ένα χάρακα κοβόταν η πηκτή στο 1/3. Έπειτα κομμάτια διηθητικού χαρτιού Wattman No3, αφού είχαν προηγουμένως εμποτισθεί στο ομογενοποιημένο μείγμα και στεγνωθεί λίγο στο διηθητικό χαρτί τοποθετούνταν στην τομή. Στο τέλος, ένα κομμάτι διηθητικού χαρτιού εμποτιζόταν σε διάλυμα κυανού της βρωμοφαινόλης για τον έλεγχο της πορείας της ηλεκτροφόρησης. Η πηκτή στη συνέχεια προσαρμοζόταν ανάμεσα στα δοχεία των ηλεκτροδίων, τα οποία έφεραν το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, καλύπτονταν μέχρι ενός ορισμένου σημείου από κάθε πλευρά με Wettex, εμποτισμένα στο ρυθμιστικό διάλυμα των ηλεκτροδίων και σκεπαζόταν με πλαστική μεμβράνη καθώς και με μεταλλικό δοχείο με πάγο ώστε να διατηρείται η θερμοκρασία σε όσο το δυνατόν χαμηλότερα επίπεδα.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή κοβόταν οριζόντια με λεπτό ανοξείδωτο σύρμα. Η ανίχνευση των ζωνών ενζυμικής δράσης γινόταν με κατάλληλη ιστοχημική χρώση. Μετά τη χρώση οι πηκτές εμβαπτίζονταν σε διάλυμα οξικού οξέος 5%. Σε ορισμένες περιπτώσεις η μονιμοποίηση γινόταν σε διάλυμα μεθανόλης/οξικού οξέος/νερού σε αναλογία 4V/1V/5V. Στη συνέχεια, αφού οι πηκτές παρέμεναν στο διάλυμα του οξικού οξέος για 24 ώρες εμβαπτίζονταν σε διάλυμα 10% γλυκερόλης, στο οποίο παρέμεναν για άλλες 12 ώρες. Τέλος, οι πηκτές τοποθετούνταν πάνω σε



γυάλινο πλαίσιο, ανάμεσα σε δύο ειδικού τύπου ζελατίνες και επωάζονταν στους 37°C για δύο ημέρες ώστε να αφυδατωθούν και να μείνει αποτυπωμένο το πρότυπο του ενζύμου.

### **Συστήματα ηλεκτροφόρησης ενζύμων**

Τα ρυθμιστικά συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ηλεκτροφορητική μελέτη των διαφόρων ενζύμων, για την παρασκευή των πηκτών και των διαλυμάτων των ηλεκτροδίων ήταν τα ακόλουθα

#### **1. Ρυθμιστικό σύστημα TCB**

##### **α. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων (Taggart *et al*, 1981)**

0,3 M βορικό οξύ

0,1 M LiOH

σε 1lt H<sub>2</sub>O, pH=8,6.

##### **β. Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής**

0,076 M Tris

0,005 M Κιτρικό οξύ

0,015 M Βορικό οξύ

0,005 M LiOH

σε 1lt H<sub>2</sub>O, pH=8,6

#### **2. Ρυθμιστικό σύστημα TP**

##### **α. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων (Guyomard & Krieg, 1983)**

0,1 M Tris

σε 1lt H<sub>2</sub>O, pH=7,4 (το pH ρυθμιζόταν σε 7,4 με NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

β. Το ρυθμιστικό διάλυμα της πηκτής παρασκευαζόταν με αραιώση 10 φορές του διαλύματος των ηλεκτροδίων.

#### **3. Ρυθμιστικό σύστημα AM.**

##### **α. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων (Taggart *et al*, 1981)**

0.04 M Κιτρικό οξύ

σε 1lt H<sub>2</sub>O

Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής

0,002 M Κιτρικό οξύ

σε 1lt H<sub>2</sub>O

Το pH των δύο διαλυμάτων ρυθμιζόταν σε 6,1 με N-(3-αμινοπροπυλ)-μορφολίνη. Στην αρχή παρασκευαζόταν το διάλυμα του κιτρικού οξέος και κατόπιν λίγο πριν χρησιμοποιηθεί ρυθμιζόταν το pH.



## **Ειδικές συνθήκες ηλεκτροφόρησης για κάθε ενζυμικό σύστημα**

### **1. EST (Εστεράση)**

Μελετήθηκε στο συκώτι.

Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

Η ηλεκτροφόρηση γινόταν σε ρυθμιστικό σύστημα TP με σταθερή τάση 260 Volts και αρχική ένταση 90 mA. Η διάρκειά της ήταν περίπου 4 ώρες.

Χρώση.

Χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη μεθοδολογία

150 ml φωσφορικό buffer 0,1M, pH=6,2

5 ml α-nafthyl acetate

5 ml β-nafthyl acetate

4 ml FBBB

4 ml FBRR

Ακολούθησε επώαση στους 37°C

### **2. AAT (Ασπαρτική αμινοτρανσφεράση).**

Μελετήθηκε στον μυϊκό ιστό και το συκώτι.

Συνθήκες ηλεκτροφόρησης.

Η ηλεκτροφόρηση γινόταν σε ρυθμιστικό σύστημα TP με σταθερή τάση 300 Volts και αρχική ένταση 90 mA. Η διάρκειά της ήταν περίπου 4 ώρες.

Χρώση

Χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη μεθοδολογία (Harris & Hopkinson, 1976)

70 ml διαλύματος 0,2 M Tris HCl, pH=8

30 ml H<sub>2</sub>O

50 ml διαλύματος 0,1 M NaOH

200 mg α-κετογλουταρικό οξύ

400 mg L-ασπαρτικό οξύ

5 mg φωσφορική πυριδοξάλη

Μετά από επώαση στους 37°C για 30 λεπτά και προσθήκη 20 ml διαλύματος 0,003 M της χρωστικής FBBB (Fast Blue BB) η επώαση συνεχιζόταν για 1 ώρα ακόμη.

### **3. AGP (α-γλυκεροφωσφορική αφυδρογονάση).**

Μελετήθηκε στο μυϊκό ιστό.

Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα TP με σταθερή τάση 230 Volts και αρχική ένταση 90 mA. Ο μέσος χρόνος ηλεκτροφόρησης ήταν 5 ώρες περίπου.

Χρώση.

Χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο διάλυμα αντίδρασης (Allendorf *et al*, 1977)

150 ml διαλύματος 0,2 M Tris HCl, pH=8

1,5 gr DL-α γλυκεροφωσφορικό άλας

5 mg NAD

3 ml διαλύματος 0,012 M MTT

2 ml διαλύματος 0,016 M PMS

Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 2 ώρες.

#### 4. LDH (Γαλακτική αφυδρογονάση)

Μελετήθηκε στον μυϊκό ιστό, στο συκώτι και το μάτι.

Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

Η ηλεκτροφόρηση για τα δείγματα που προέρχονταν από το μυϊκό ιστό, το συκώτι και το μάτι, γινόταν σε ρυθμιστικό σύστημα TCB. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε σταθερή τάση 200 Volts και αρχική ένταση 60 mA και διαρκούσε 12-15 ώρες.

Χρώση

Χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο διάλυμα (Harris & Hopkinson, 1976)

150 ml διαλύματος 0,2 M Tris HCL pH=8

2 ml άλατος νατρίου του DL-γαλακτικού οξέος

5 mg NAD

3 ml διαλύματος 0.012 M MTT

2 ml διαλύματος 0,016 M PMS

Ακολούθησε επώαση στους 37°C στο σκοτάδι για 30 λεπτά.

#### 5. XO (Οξειδάση της ξανθίνης)

Μελετήθηκε στο συκώτι.

Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

Η ηλεκτροφόρηση γινόταν σε ρυθμιστικό σύστημα TCB, σε σταθερή τάση 200 Volts και αρχική ένταση 60 mA και διαρκούσε 12-15 ώρες

Χρώση

Χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο διάλυμα

150 ml διαλύματος 0,2 M Tris HCL, pH=8

250 mg υποξανθίνη

Ζεσταίνουμε μέχρι να λυώσει. Στη συνέχεια προσθέτουμε

3 ml διαλύματος 0,012 M MTT

2 ml διαλύματος 0,016 M PMS

Ακολουθεί επώαση στους 37°C

#### 6. SOD (Υπεροξεική δισμουτάση)

Μελετήθηκε στο συκώτι.

Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

Η ηλεκτροφόρηση γινόταν σε ρυθμιστικό σύστημα TCB, σε σταθερή τάση 200 Volts και αρχική ένταση 60 mA και διαρκούσε 12-15 ώρες.

Χρώση

Χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένη η μεθοδολογία που περιγράφηκε από τους Harris & Hopkinson, 1976

150 ml διαλύματος 0,2 M Tris HCl, pH=8

3 ml διαλύματος 0,012 M MTT

2 ml διαλύματος 0,016 M PMS

Ακολούθησε έκθεση της επιφάνειας της πηκτής στο φως για 2 λεπτά και στη συνέχεια επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 37°C.

#### 7. IDH (Ισοκιτρική αφυδρογονάση)

Μελετήθηκε στο συκώτι.

Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

Η ηλεκτροφόρηση γινόταν σε ρυθμιστικό σύστημα AM, με σταθερή τάση 300 Volts και αρχική ένταση 90 mA. Η διάρκειά της ήταν 4 ώρες περίπου.

Χρώση

Χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω διάλυμα (Allendorf *et al*, 1977)

150 ml διαλύματος 0,2 M Tris HCL, pH=8

60 mg Ισοκιτρικό οξύ

10 mg NADP

2 ml διαλύματος Χλωριούχου Μαγνησίου, MgCl<sub>2</sub>

3 ml διαλύματος 0.012 M MTT

2 ml διαλύματος 0,016 M PMS

Ακολούθησε επώαση στο σκοτάδι στους 37°C.

#### 8. ADH (Αλκοολική δευδρογενάση)

Μελετήθηκε στο συκώτι.

Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

Η ηλεκτροφόρηση γινόταν σε ρυθμιστικό σύστημα AM σε σταθερή τάση 300 Volts και αρχική ένταση 90mA και διαρκούσε 4 ώρες.

Χρώση

Αφού διαλυθούν 10 mg NAD σε 3 - 4 ml αιθανόλης προσθέτουμε και αναμιγνύουμε 150 ml διαλύματος 0,2 M Tris HCL, pH=8

3 ml διαλύματος 0.012 M MTT

2 ml διαλύματος 0,016 M PMS

Ακολουθεί επώαση στο σκοτάδι για 10-15 λεπτά.

9. MDH (Μαλική αφυδρογονάση)

Μελετήθηκε στο συκώτι.

Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό σύστημα AM, με σταθερή τάση 230 Volts και αρχική ένταση 90mA. Ο μέσος χρόνος ηλεκτροφόρησης ήταν 5 ώρες περίπου.

Χρώση

Χρησιμοποιήθηκε τροποποιημένη η μεθοδολογία που περιγράφηκε από τους Allendorf *et al* (1977)

150 ml διαλύματος 0,2 M Tris HCL, pH=8

20 ml διαλύματος DL-malic acid

5 mg NAD

3 ml διαλύματος 0,012 M MTT

2 ml διαλύματος 0,016 M PMS

Ακολούθησε επώαση στο σκοτάδι στους 37°C.

10. PGM (Φωσφογλυκομουτάση).

Μελετήθηκε στο μυϊκό ιστό.

Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό σύστημα TCB, σε σταθερή τάση 200 Volts και αρχική ένταση 60mA και διαρκούσε 12-15 ώρες.

Χρώση

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της επίστρωσης με άγαρ (Harris & Hopkinson, 1976).

Σε 25 ml διαλύματος 0,2 M Tris HCL, pH=8 και 75 ml H<sub>2</sub>O προσθέτουμε 1,5 gr άγαρ και θερμαίνουμε μέχρι να λυώσει. Όταν η θερμοκρασία φθάσει τους 56°C προσθέτουμε το παρακάτω διάλυμα

21 ml H<sub>2</sub>O

9 ml διαλύματος 0,2 M Tris HCL, pH=8

1 gr 1-φωσφορικής γλυκόζης.

3 ml διαλύματος 0,5 M χλωριούχου μαγνησίου,  $MgCl_2$

10 mg NADP

50 μονάδες(18μl) αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης

3 ml διαλύματος 0,012 M MTT

2 ml διαλύματος 0,016 M PMS

Ακολουθεί επώαση στο σκοτάδι στους 37°C.

11. PGI (Γλυκοζοφωσφορική ισομεράση)

Μελετήθηκε στον μυϊκό ιστό.

Συνθήκες ηλεκτροφόρησης

Η ηλεκτροφόρηση γινόταν σε ρυθμιστικό σύστημα TCB, σε σταθερή τάση 200 Volts και αρχική ένταση 60mA. Η διάρκειά της ήταν 12-15 ώρες.

Χρώση

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος επικάλυψης με άγαρ (Harris & Hopkinson, 1976)

Σε 15 ml 0,2 M Tris HCL, pH=8 και 45 ml  $H_2O$  προσθέτουμε 1 gr άγαρ και θερμαίνουμε μέχρι να λυώσουν. Ενα άλλο διάλυμα με 9 ml  $H_2O$  και 3 ml 0,2 M Tris HCL, pH=8 το μοιράζουμε στα δύο και στο πρώτο προσθέτουμε 100 mg 6-φωσφορικής φρουκτόζης.

Στο δε δεύτερο προσθέτουμε

10 ml διαλύματος χλωριούχου μαγνησίου,  $MgCl_2$

50 μονάδες (units) G-6PDH (αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης)

10 mg NADP

3 ml διαλύματος 0,012 M MTT

2 ml διαλύματος 0,016 M PMS

Ακολουθεί επώαση στο σκοτάδι στους 37°C.

12. CK (Κρεατινική κινάση).

Μελετήθηκε στο μάτι και το μυϊκό ιστό.

Συνθήκες ηλεκτροφόρησης.

Η ηλεκτροφόρηση γινόταν σε ρυθμιστικό σύστημα TCB, σε σταθερή τάση 200 Volts και αρχική ένταση 60 mA και διαρκούσε 12-15 ώρες.

Χρώση

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της επίστρωσης με άγαρ (Harris & Hopkinson, 1976)

Σε 50 ml διαλύματος 0,1 M Tris HCL, pH=7 (25 ml Tris +25 ml H<sub>2</sub>O) προσθέτουμε 1 gr άγαρ και θερμαίνουμε έως βρασμού. Όταν η θερμοκρασία έφθανε τους 56°C προσθέταμε

50 ml 0,1 M Tris HCL, pH=7 (25 ml Tris+25 ml H<sub>2</sub>O)

100 mg φωσφοκρεατίνη, Na<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

60 mg ADP

100 mg γλυκόζη

2 ml διαλύματος 0,5 M χλωριούχου μαγνησίου, MgCl<sub>2</sub>

80 μονάδες (20μl) εξοκινάση

80 μονάδες (20μl) G-6PDH

10 mg NADP

3 ml διαλύματος 0,012 M MTT

2 ml διαλύματος 0,016 M PMS

Ακολουθούσε επώαση στο σκοτάδι στους 37°C.

## 2. RAPD

### Εξαγωγή και απομόνωση του DNA

Η εξαγωγή και η απομόνωση του ολικού DNA που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί μία τροποποιημένη εφαρμογή του πρωτοκόλλου των Cenis *et al*, 1993.

Σε σωλήνα erppendorf ομογενοποιούνται περίπου 50 mg λευκού μυϊκού ιστού (αποθηκευμένου στους 40°C) σε 200 μl buffer απομόνωσης (200 mM Tris-HCL, pH=8,5, 200 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS) προστίθενται 200 μl οξικού νατρίου 3 M, pH=5,2 και ο σωλήνας τοποθετείται στους -20°C για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15 λεπτά και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε άλλο σωλήνα. Στη συνέχεια, με διαδοχικές εκχυλίσσεις με φαινόλη, φαινόλη / χλωροφόρμιο / ισοαμυλική αλκοόλη (25V/1V/1V) και χλωροφόρμιο / ισοαμυλική αλκοόλη (24V/1V) καθαρίζεται το DNA. Υστερα από καθίζηση με παγωμένη αιθανόλη 100% (2 ώρες στους -20°C), το ίζημα του DNA συγκεντρώνεται με φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 20 λεπτά. Ακολουθεί πλύση με 70% αιθανόλη και λυοφιλοποίηση. Τέλος, το DNA επαναιωρείται σε 100 μl buffer TE ( 100 mM Tris HCL, 1 mM EDTA, pH=8 ).



## Εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν και συνθήκες ενίσχυσης των δεικτών RAPD

Κατά τη διάρκεια της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 5 εκκινητικά μόρια (primers) των οποίων η προμήθεια έγινε από την Operon Technologies, Alameda, CA, USA.

Οι τελικές συνθήκες ενίσχυσης αποφασίστηκαν ύστερα από δοκιμαστικά πειράματα για τον προσδιορισμό της επίδρασης των συγκεντρώσεων DNA, dNTPs, Mg, Taq πολυμεράσης καθώς και τον καθορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας συγκόλλησης των εκκινητών. Έτσι τελικά οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν σε μίγμα αντίδρασης όγκου 25  $\mu$ l που περιείχε 30 ng μητρικού DNA, μία μονάδα Taq πολυμεράσης, (Minotech, Greece) , 0,25 buffer αντίδρασης (500 mM KCL, 100 mM Tris, pH=9). Για τον έλεγχο της επιμόλυνσης των αντιδράσεων με ξένο DNA, πραγματοποιήθηκαν αρνητικοί έλεγχοι, παραλείποντας το DNA από το μίγμα αντίδρασης.

Οι συνθήκες ενίσχυσης περιελάμβαναν ένα σύνολο 35 κύκλων των 40 sec στους 94°C, 1 λεπτό στους 38°C, 1 λεπτό στους 72°C, χρησιμοποιώντας τις γρηγορότερες διαθέσιμες μεταβάσεις μεταξύ των θερμοκρασιών. Τέλος, το μίγμα τοποθετήθηκε στους 4°C μέχρι την ηλεκτροφόρηση.

Προκειμένου να προσδιορισθούν γενετικοί δείκτες που θα μπορούσαν να ταυτοποιήσουν (ή να διαχωρίσουν τα είδη) ελέγχθησαν 10 άτομα από κάθε είδος και 4 άτομα από κάθε είδος (OPA 4, 7, 10, 13, 20) με όλους τους εκκινητές σε πηκτή αгарόζης και ακρυλαμίδης αντίστοιχα.

Για τον εντοπισμό συγκεκριμένων δεικτών RAPD μεταξύ των ειδών, διαχωρίστηκαν 10  $\mu$ l του μίγματος των προϊόντων ενίσχυσης σε μία πηκτή αгарόζης 1,4%, που περιείχε 0,5  $\mu$ l X 1 ml βρωμιούχο αιθίδιο σε buffer TAE (40 mM Tris/acetate, 1 mM EDTA).

Οι ζώνες εμφανίστηκαν σε συσκευή UV και φωτογραφήθηκαν. Μετά από άμεση παρατήρηση του προτύπου ζωνών στη συσκευή UV, οι φωτογραφίες χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση των ενισχυμένων προϊόντων. Για τον καθορισμό γενετικών διαφορών μεταξύ των ειδών διαχωρίστηκαν άλλα 10  $\mu$ l προϊόντων ενίσχυσης σε κάθετες πηκτές πολυακρυλαμίδης 6%, σε buffer TBE (0,89 M Tris, 0,89 M boric acid, 0,11 M EDTA, pH=8,3). Μετά την ηλεκτροφόρηση οι πηκτές μονιμοποιήθηκαν με 10% αιθανόλη και 0,5% οξικό οξύ, 2 φορές για 3 λεπτά, με 0,1% νιτρικό άργυρο για 10 λεπτά, καθαρίστηκαν 2 φορές με απεσταγμένο νερό

και εμφανίστηκαν σε ένα αλκαλικό διάλυμα (1,5% NaOH, 0,1% NaBH<sub>4</sub> και 0,15% H<sub>2</sub>O).

Προς αποφυγή προβλημάτων, όπως η μεταβολή του αριθμού και της έντασης των προϊόντων ενίσχυσης, εξαιτίας των συγκεντρώσεων των DNA, MgCl<sub>2</sub>, Taq polymerase, dNTPs και των μεθόδων χρώσης των πηκτών, οι συγκρίσεις κινητικότητας των ζωνών έγιναν μόνο εντός των πηκτών και βασίστηκαν στην ίδια αντίδραση PCR. Από την ανάλυση αποκλείστηκαν οποιαδήποτε αταίριαστα πρότυπα DNA που προέκυψαν εξαιτίας της μη ικανοποιητικής ενίσχυσης.

### 3. mtDNA

#### Διαδικασία ανάλυσης του mtDNA

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη διαδικασία ανάλυσης του mtDNA.

1. Εξαγωγή μιτοχονδριακού DNA
2. Πολλαπλασιασμός τμημάτων του mtDNA με χρήση PCR
3. Πέψεις των τμημάτων που ενισχύθηκαν με την PCR με διάφορα ένζυμα περιορισμού
4. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

#### 1. Εξαγωγή μιτοχονδριακού DNA

Η εξαγωγή του mtDNA έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Bernatchez *et al*, 1988, μερικώς τροποποιημένο. Τα στάδια που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

α. Μικρή ποσότητα συκωτιού 0,5 gr (διατηρημένο στους -40°C) ομογενοποιείται σε γυάλινο σωλήνα σε 1 ml διαλύματος TEK της ακόλουθης σύστασης

TEK=Tris 0,05 M (pH=7,5) - EDTA 0,01 M (pH=8) -KCl 0,2 M.

Στη συνέχεια, το ομογενοποίημα μεταφέρεται σε σωλήνες φυγοκέντρου (σωλήνες Corex) των 30 ml και προσθέτουμε 15 ml διαλύματος TEK. Γίνεται φυγοκέντρωση στις 3000 rpm για 10 λεπτά. Έτσι πραγματοποιείται καθίζηση των πυρήνων.

β. Το υπερκείμενο, που περιέχει τα μιτοχόνδρια μεταφέρεται σε ένα νέο σωλήνα Corex όπου και προστίθενται άλλα 15 ml διαλύματος TEK. Ακολουθεί νέα φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 40 λεπτά. Έτσι πραγματοποιείται καθίζηση των μιτοχονδρίων.

γ. Απομακρύνεται το υπερκείμενο.

- δ. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1 ml TEK. Προστίθενται 120 µl Triton 10X. Υστερα από έντονη ανάδευση μένουν για 20 λεπτά στον πάγο προκειμένου να επέλθει η λύση των μιτοχονδρίων. Γίνεται επαναφυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 10 λεπτά.
- ε. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε σωλήνες errendorf των 2 ml και προστίθεται ίσος όγκος εξισορροπημένης φαινόλης και ύστερα από έντονη ανάδευση σε Vortex ακολουθεί νέα φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 20 λεπτά.
- στ. Η υπερκείμενη υδάτινη φάση μεταφέρεται προσεκτικά σε καθαρούς σωλήνες errendorf και εκχυλίζεται με ίσους όγκους εξισορροπημένης φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24V/24V/1V). Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 5 λεπτά.
- ζ. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα errendorf και εκχυλίζεται με ίσο όγκο χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24V/1V), αναδεύεται και επαναφυγοκεντρείται στις 13000 rpm για 5 λεπτά.
- η. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα errendorf και προστίθεται 1,5 ml παγωμένης αλκοόλης 99%. Επειτα από ανάδευση το διάλυμα παραμένει στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για όλη την νύχτα (ή στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για 1 ώρα).
- θ. Απομακρύνεται το υπερκείμενο. Το δείγμα ξηραίνεται σε κενό αέρος για 15 λεπτά (σε κλίβανο ή σε λυοφιλητή), απομακρύνοντας έτσι τυχόν ίχνη αιθανόλης τα οποία μπορούν να εμποδίσουν τη δράση των ενζύμων.
- ι. Τέλος, το ίζημα διαλύεται σε 100-200 µl  $\text{H}_2\text{O}$  και διατηρείται στους  $4^{\circ}\text{C}$  ή σε χαμηλή θερμοκρασία.

Η ποιότητα της εξαγωγής του mtDNA ελέγχεται με τη χρήση 5 µl από το διαλυμένο υλικό σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 0,7% (διάρκειας 1 ώρας, τάσης 100 Volts) που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE. Εφόσον το αποτέλεσμα είναι θετικό, το mtDNA είναι έτοιμο να χρησιμοποιηθεί σε πολλαπλασιασμό με την PCR.

### **Πολλαπλασιασμός mtDNA με τη χρήση PCR.**

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 3 ζεύγη εκκινητικών μορίων για τον πολλαπλασιασμό με την PCR τριών τμημάτων του mtDNA. Συγκεκριμένα Για τον πολλαπλασιασμό τμήματος 360 περίπου βάσεων του κυτοχρώματος b, χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω ζευγάρι εκκινητικών μορίων που σχεδιάστηκε από τους Kocher *et al*, 1989 και τροποποιήθηκε από τους Mc Veigh *et al*, 1991

L 14841 5'>AAA AAG CTT CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-<3'

H 15149 5'>AAA CTG CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC A-<3'

Για τον πολλαπλασιασμό της οξειδάσης του κυτοχρώματος c COII χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές (Normark *et al*, 1991)

L 7450 5'>AAA GGA AGG AAT CGA ACC CCC <3'

H 8055 5'>GCT CAT GAG TGG AGG ACG TCT T-<3'

Τέλος, για τον πολλαπλασιασμό του ριβοσωμικού RNA, 12s-16s rRNA χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές (Kocher *et al*, 1989, Palumbi *et al*, 1991)

L 1091 5'>AAA AAG CTT CAA ACT GGG ATT AGA TAC CCC ACT AT-<3'

H 3080 5'>CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-<3'

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό του κυτοχρώματος b θεωρούνται «παγκόσμιοι» εκκινητές καθώς πολλαπλασιάζουν τα ίδια τμήματα σε διάφορους οργανισμούς.

Ο πολλαπλασιασμός του δίκλωνου DNA πραγματοποιήθηκε σε όγκους αντιδράσεων 50 μl που περιείχαν

- 2 μονάδες Taq DNA πολυμεράση
- 5 μl ρυθμιστικό διάλυμα Taq 10 x [200 mM (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>, 750 mM Tris-HCl, pH=9, 0,1% w/v Tween]
- 2,5 mM (cyt b) ή 4.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTPs (από 2,5 για κάθε dNTP)
- 30 pmoI από κάθε εκκινητή και
- 1 μl (περίπου 50 -100ng DNA) από το DNA κάθε ατόμου.

Ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός των τριών τμημάτων του mtDNA πραγματοποιήθηκε σε συσκευή Eppendorf ως εξής, για τα 3 διαφορετικά τμήματα Cyt b

- α. 5 min στους 94°C
- β. 30 sec στους 94°C
- γ. 30 sec στους 50°C
- δ. 45 sec στους 72°C
- ε. 10 min στους 72°C

COII

- α. 5 min στους 94°C
- β. 30 sec στους 94°C
- γ. 30 sec στους 50°C
- δ. 75 sec στους 72°C
- ε. 10 min στους 72°C

## 12s –16s rRNA

- α. 5 min στους 95°C
- β. 40 sec στους 94°C
- γ. 60 sec στους 50°C
- δ. 120 sec στους 72°C
- ε. 10 min στους 72°C

Οι κύκλοι για τα στάδια β - δ επαναλαμβάνονται 38 φορές. Τέλος, ακολουθεί μία τελική επιμήκυνση των αλυσίδων στους 72°C για 10 λεπτά.

Μετά τον πολλαπλασιασμό, το προϊόν της PCR ελέγχεται σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 2% που περιέχει βρωμιούχο αιθύδιο (0,5 µg/ml) στα 100 Volts σε διάλυμα TBE και στη συνέχεια τα τμήματα του mtDNA εξετάζονται κάτω από υπεριώδες φως.

### **Πέψεις των τμημάτων που ενισχύθηκαν με την PCR με ένζυμα περιορισμού**

Τα τμήματα του mtDNA που πολλαπλασιάστηκαν με την τεχνική της PCR εξετάστηκαν στη συνέχεια για την ύπαρξη πολυμορφισμών με τις παρακάτω 14 ενδονουκλεάσες περιορισμού: Alu I, Hae III, Msp I, BstI, Ava II, Dde I, Hinf I, BamHI, Ban I, EcoRI, Hinc II, Pst I, Xba I, Ase I. Για κάθε δείγμα, 5-10 µl από το προϊόν της PCR (πολλαπλασιασμένα τμήματα του mtDNA) πέφθηκαν με τα παραπάνω ένζυμα περιορισμού. Οι αντιδράσεις των πέψεων, καθώς και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν, έγιναν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των κατασκευαστριών εταιριών (NEBiolabs, Gibco BRL). Τα προϊόντα των πέψεων των τμημάτων του mtDNA διαχωρίστηκαν σε ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδης 8%, με σκοπό τον καλύτερο διαχωρισμό τους.

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **1. Δεδομένα ισοενζύμων**

Από τους 18 γονιδιακούς τόπους που εξετάστηκαν (Πίνακας 3), δύο ήταν πολυμορφικοί (EST-1 και XO) και 11 ήταν μονομορφικοί (mAAT, CK-1, CK-2, LDH-A, LDH-B, MDH, PGI-1, PGI-2, PGI-3, PGM και SOD) και στα τέσσερα είδη. Οι υπόλοιποι πέντε γονιδιακοί τόποι (sAAT-1, sAAT-2, ADH-1, IDH-1 και αGPDH-1) ήταν πολυμορφικοί σε τουλάχιστον ένα είδος. Τρεις γονιδιακοί τόποι (CK-1, LDH-A και PGI-1) παρουσίασαν το ίδιο ηλεκτροφορητικό πρότυπο και στα τέσσερα είδη. Ο

**Πίνακας 3.** Συχνότητες αλληλομόρφων για όλους τους γονιδιακούς τόπους και μετρήσεις της γενετικής ποικιλομορφίας στα 4 είδη. Ένας τόπος θεωρείται πολυμορφικός εάν η συχνότητα του πιο κοινού αλληλόμορφου δεν υπερβαίνει το 0.99. *H*<sub>0</sub>: παρατηρούμενη ετεροζυγωτία, *H*<sub>e</sub>: Hardy-Weinberg αναμενόμενη ετεροζυγωτία. Οι τιμές στις παρενθέσεις είναι οι αποκλίσεις.

Γον. Τόποι	Αλληλ.	<i>M. barbatus</i>	<i>M. surmuletus</i>	<i>U. moluccensis</i>	<i>P. prayensis</i>
<i>mAAT-1</i> *	150	0.000	0.000	1.000	1.000
	100	1.000	1.000	0.000	0.000
<i>sAAT-1</i> *	140	0.000	0.067	0.000	0.000
	120	0.000	0.146	0.000	0.000
	100	1.000	0.787	0.000	0.000
	80	0.000	0.000	1.000	1.000
<i>sAAT-2</i> *	110	0.350	0.404	0.000	0.000
	100	0.650	0.596	1.000	1.000
<i>ADH-1</i> *	200	0.000	0.000	0.761	0.000
	180	0.000	0.000	0.239	0.075
	145	0.031	0.000	0.000	0.000
	130	0.031	0.000	0.000	0.800
	100	0.938	1.000	0.000	0.125
<i>CK-1</i> *	100	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>CK-2</i> *	100	1.000	1.000	0.000	1.000
	75	0.000	0.000	1.000	0.000
<i>EST-1</i> *	115	0.000	0.000	0.167	0.000
	110	0.187	0.213	0.389	0.513
	107	0.394	0.360	0.211	0.487
	100	0.419	0.427	0.233	0.000
<i>αGPD-1</i> *	120	0.000	0.073	0.000	0.000
	100	1.000	0.562	0.435	0.000
	80	0.000	0.000	0.000	0.427
	70	0.000	0.017	0.565	0.000
	60	0.000	0.000	0.000	0.573
	40	0.000	0.348	0.000	0.000
<i>IDH-1</i> *	150	0.000	0.000	0.000	1.000
	140	0.012	0.157	0.000	0.000
	110	0.000	0.000	1.000	0.000
	100	0.988	0.843	0.000	0.000



Πίνακας 3 (συνέχεια)

<i>LDH-A*</i>	100	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>LDH-B*</i>	100	1.000	1.000	0.000	0.000
	80	0.000	0.000	1.000	1.000
<i>MDH*</i>	200	0.000	0.000	1.000	1.000
	100	1.000	1.000	0.000	0.000
<i>PGI-1*</i>	100	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>PGI-2*</i>	100	1.000	0.000	0.000	1.000
	80	0.000	0.000	1.000	0.000
	60	0.000	1.000	0.000	0.000
<i>PGI-3*</i>	100	1.000	0.000	1.000	0.000
	60	0.000	1.000	0.000	1.000
<i>PGM*</i>	110	0.000	0.000	0.000	1.000
	100	1.000	0.000	0.000	0.000
	80	0.000	0.000	1.000	0.000
	60	0.000	1.000	0.000	0.000
<i>SOD*</i>	100	1.000	0.000	0.000	0.000
	70	0.000	1.000	0.000	1.000
	40	0.000	0.000	1.000	0.000
<i>XO*</i>	110	0.219	0.253	0.159	0.000
	100	0.506	0.489	0.636	0.487
	93	0.275	0.115	0.205	0.513
	60	0.000	0.143	0.000	0.000
<i>Μέσος αριθμός δείγματος ανά γονιδιακό τόπο</i>		56	52	46	42
<i>Μέσος αριθμός αλληλομ ανά γονιδιακό τόπο.</i>		1.6 (0.2)	1.7 (0.3)	1.4 (0.2)	1.3 (0.1)
<i>% Πολυμορφικοί τόποι</i>		38.9	33.3	22.2	22.3
<i>Ho</i>		0.084 (0.041)	0.165 (0.064)	0.126 (0.066)	0.086 (0.050)
<i>He</i>		0.105 (0.052)	0.166 (0.060)	0.118 (0.056)	0.103 (0.047)

αριθμός των διαγνωστικών τόπων κυμαινόταν από 3 μεταξύ των *M. barbatus* και *M. surmulletus* μέχρι 11 μεταξύ των *M. surmulletus* και *U. moluccensis* (Πίνακες 3 και 6).

Ο μέσος αριθμός των αλληλομόρφων για κάθε γονιδιακό τόπο κυμάνθηκε από 1,3 στο *P. prayensis* μέχρι 1,7 στο *M. surmulletus* (Πίνακας 3), ενώ το ποσοστό των πολυμορφικών τόπων κυμάνθηκε από 22,2 στο *U. moluccensis* μέχρι 38,9 στο *M. barbatus* (Πίνακας 3). Οι τιμές της παρατηρούμενης ( $H_o$ ) και της αναμενόμενης ( $H_e$ ) ετεροζυγωτίας κυμάνθηκαν από 0,084 και 0,105 στο *M. barbatus* μέχρι 0,165 και 0,166 στο *M. surmulletus* αντίστοιχα (Πίνακας 3).

Επτά από τις 19 αναλύσεις γενοτυπικής ταύτισης με τις προβλέψεις των Hardy-Weinberg έδειξαν σημαντικές αποκλίσεις από τις εκτιμήσεις Hardy-Weinberg μετά τις διορθώσεις Bonferroni. Αυτές οι αποκλίσεις συνέβαιναν στους ακόλουθους γονιδιακούς τόπους και είδη: ΧΟ (ετεροζυγωτική ανεπάρκεια) στο *M. barbatus*, IDH-1 (ετεροζυγωτική ανεπάρκεια) στο *M. surmulletus*, ΧΟ, ADH-1 (ετεροζυγωτικές ανεπάρκειες) και αGPDH-1 (ετεροζυγωτικός πλεονασμός) στο *U. moluccensis* και τελικά EST-1 (ετεροζυγωτική ανεπάρκεια) και αGPDH-1 (ετεροζυγωτικός πλεονασμός) στο *P. prayensis*.

Οι ανά ζεύγη συγκρίσεις της γενετικής απόστασης ( $D$ ) του Nei (1978) ήταν 0,316 μεταξύ ειδών του ίδιου γένους (*M. barbatus*- *M. surmulletus*) και κυμάνθηκε από 0,606 μέχρι 1,237 μεταξύ ειδών που ανήκαν σε διαφορετικά γένη (Πίνακας 6). Το είδος *Upeneus moluccensis* ήταν γενετικά το πιο διαφοροποιημένο από τα είδη του γένους *Mullus*. Δενδρογράμματα που κατασκευάστηκαν με τις μεθόδους neighbour-joining και της φειδωλότητας παρουσιάζονται στην εικόνα 4.

## 2. Δεδομένα RAPD

Οκτώ από τα εκκινητικά μόρια που εξετάστηκαν απέδωσαν ικανοποιητικά προϊόντα ενίσχυσης με όλα τα δείγματα (Πίνακας 4). Όλοι οι εκκινητές έδωσαν ειδικά πρότυπα RAPD για το κάθε είδος. Δεκαπέντε από τα 20 τμήματα DNA που επεξεργάστηκαν με τα πέντε ένζυμα περιορισμού παρουσίασαν πρότυπα πέψεως που έδειχναν ομολογία μεταξύ των ζωνών ταυτόχρονης μετακίνησης. Για δύο τμήματα, τα πρότυπα πέψεως βρέθηκαν εντελώς διαφορετικά και για άλλα τρία τμήματα δεν ανιχνεύθηκαν κλάσματα περιορισμού. Αυτές οι τελευταίες πέντε ζώνες RAPD αποκλείστηκαν από την περαιτέρω ανάλυση.

Τελικά, 80 συνολικά ζώνες αναλύθηκαν σε ηλεκτροφορήσεις πολυακρυλαμίδης για τα τέσσερα είδη και με τους οκτώ εκκινητές (Πίνακας 4). Ο

**Πίνακας 4.** Οι συχνότητες του μηδενικού αλληλόμορφου για τους 80 RAPD δείκτες που μελετήθηκαν στα 4 είδη, οι αριθμοί (n) των ατόμων που αναλύθηκαν και η εκτιμηθείσα ετεροζυγωτία (*Hi*) μέσα σε κάθε είδος. Κάθε δείκτης αναφέρεται με το όνομα του εκκινητή και το μεγεθός του σε ζεύγη βάσεων.

RAPD δείκτες	<i>M. barbatus</i> n=20	<i>M. surmuletus</i> n=20	<i>U. moluccensis</i> n=20	<i>P. prayensis</i> n=20
OPA02 <sub>1320</sub>	0.000	0.000	0.000	1.000
OPA02 <sub>1150</sub>	0.447	0.447	1.000	1.000
OPA02 <sub>840</sub>	1.000	0.000	1.000	0.000
OPA02 <sub>760</sub>	0.000	0.000	0.000	1.000
OPA02 <sub>620</sub>	1.000	0.000	1.000	1.000
OPA02 <sub>550</sub>	0.000	0.500	0.000	1.000
OPA02 <sub>500</sub>	0.836	0.387	0.742	0.670
OPA02 <sub>410</sub>	1.000	1.000	0.000	0.836
OPA02 <sub>300</sub>	1.000	1.000	0.000	0.000
OPA03 <sub>1320</sub>	0.000	0.000	1.000	1.000
OPA03 <sub>1200</sub>	0.000	0.000	1.000	1.000
OPA03 <sub>850</sub>	0.500	1.000	1.000	1.000
OPA03 <sub>810</sub>	0.000	0.774	1.000	1.000
OPA03 <sub>760</sub>	0.447	1.000	1.000	1.000
OPA03 <sub>690</sub>	0.000	0.000	1.000	1.000
OPA03 <sub>660</sub>	1.000	1.000	0.000	0.000
OPA03 <sub>600</sub>	1.000	0.500	0.866	0.866
OPA03 <sub>550</sub>	1.000	0.447	0.632	1.000
OPA03 <sub>490</sub>	0.387	0.000	0.707	1.000
OPA03 <sub>380</sub>	0.000	0.670	0.707	0.632
OPA03 <sub>280</sub>	0.806	0.000	0.000	0.742
OPA04 <sub>1590</sub>	0.000	0.548	0.774	0.000
OPA04 <sub>1200</sub>	0.707	0.447	0.742	0.670
OPA04 <sub>1100</sub>	1.000	0.742	0.500	1.000
OPA04 <sub>950</sub>	1.000	1.000	1.000	0.000
OPA04 <sub>880</sub>	1.000	0.670	0.000	0.670
OPA04 <sub>800</sub>	0.000	1.000	0.547	0.707
OPA04 <sub>690</sub>	0.742	0.894	1.000	1.000
OPA04 <sub>600</sub>	1.000	0.836	0.000	1.000
OPA04 <sub>500</sub>	1.000	1.000	0.592	0.000
OPA04 <sub>480</sub>	1.000	1.000	1.000	0.000
OPA04 <sub>410</sub>	1.000	0.894	0.000	0.774
OPA05 <sub>1000</sub>	0.000	0.447	1.000	0.894
OPA05 <sub>880</sub>	1.000	1.000	0.866	0.866
OPA05 <sub>800</sub>	1.000	1.000	0.447	0.387
OPA05 <sub>750</sub>	1.000	0.500	1.000	0.000

**Πίνακας 4** (συνέχεια)

ΟΡΑ05 <sub>680</sub>	0.866	0.500	1.000	0.000
ΟΡΑ05 <sub>610</sub>	0.707	0.447	0.894	0.447
ΟΡΑ05 <sub>550</sub>	1.000	0.836	1.000	0.500
ΟΡΑ05 <sub>500</sub>	1.000	1.000	0.000	1.000
ΟΡΑ05 <sub>460</sub>	0.000	0.000	0.000	0.500
ΟΡΑ05 <sub>320</sub>	1.000	1.000	0.447	0.836
ΟΡΑ06 <sub>1350</sub>	0.670	0.632	1.000	1.000
ΟΡΑ06 <sub>1100</sub>	0.000	0.866	1.000	1.000
ΟΡΑ06 <sub>900</sub>	1.000	0.806	0.547	1.000
ΟΡΑ06 <sub>790</sub>	1.000	1.000	0.500	1.000
ΟΡΑ06 <sub>700</sub>	1.000	1.000	1.000	0.000
ΟΡΑ06 <sub>650</sub>	0.000	0.670	0.500	0.447
ΟΡΑ06 <sub>620</sub>	0.000	0.000	1.000	1.000
ΟΡΑ06 <sub>570</sub>	1.000	0.000	1.000	0.000
ΟΡΑ06 <sub>500</sub>	1.000	0.000	0.447	0.000
ΟΡΑ06 <sub>430</sub>	0.000	0.894	0.774	0.000
ΟΡΑ06 <sub>350</sub>	1.000	0.774	0.000	0.000
ΟΡΑ07 <sub>1700</sub>	0.000	1.000	1.000	0.547
ΟΡΑ07 <sub>1500</sub>	0.000	0.500	0.000	0.000
ΟΡΑ07 <sub>1250</sub>	0.632	0.707	0.000	1.000
ΟΡΑ07 <sub>930</sub>	1.000	1.000	1.000	0.000
ΟΡΑ07 <sub>800</sub>	0.000	0.632	1.000	1.000
ΟΡΑ07 <sub>780</sub>	0.000	1.000	0.000	0.000
ΟΡΑ07 <sub>650</sub>	0.000	0.447	1.000	0.670
ΟΡΑ07 <sub>500</sub>	0.000	0.447	0.000	0.000
ΟΡΑ07 <sub>360</sub>	1.000	1.000	0.447	0.387
ΟΡΑ07 <sub>220</sub>	1.000	1.000	1.000	0.000
ΟΡΑ09 <sub>1250</sub>	1.000	1.000	1.000	0.000
ΟΡΑ09 <sub>1080</sub>	1.000	0.000	0.670	0.742
ΟΡΑ09 <sub>930</sub>	0.000	0.000	1.000	1.000
ΟΡΑ09 <sub>700</sub>	1.000	0.000	1.000	1.000
ΟΡΑ09 <sub>560</sub>	1.000	1.000	1.000	0.000
ΟΡΑ09 <sub>370</sub>	1.000	1.000	0.387	1.000
ΟΡΑ09 <sub>260</sub>	1.000	1.000	1.000	0.447
ΟΡΑ10 <sub>1450</sub>	0.742	0.000	1.000	1.000
ΟΡΑ10 <sub>1300</sub>	1.000	1.000	1.000	0.000
ΟΡΑ10 <sub>1200</sub>	1.000	1.000	0.000	0.500
ΟΡΑ10 <sub>1070</sub>	0.000	1.000	0.836	0.500
ΟΡΑ10 <sub>950</sub>	1.000	0.866	0.500	0.387
ΟΡΑ10 <sub>850</sub>	0.387	0.670	0.806	0.000
ΟΡΑ10 <sub>780</sub>	1.000	0.742	1.000	1.000
ΟΡΑ10 <sub>650</sub>	1.000	0.670	1.000	1.000
ΟΡΑ10 <sub>520</sub>	1.000	0.000	1.000	1.000
ΟΡΑ10 <sub>470</sub>	1.000	1.000	0.000	1.000
<i>Hi</i>	0.072	0.173	0.129	0.123

αριθμός των ζωνών που παρατηρήθηκαν κυμάνθηκε από 7 μέχρι 12 για κάθε εκκινητικό μόριο και το μέγεθος των τμημάτων από 0,22 μέχρι 1,7 kb. Στον ίδιο πίνακα δίνονται οι εκτιμηθείσες συχνότητες των αλληλομόρφων. Οι διαγνωστικές ζώνες (πάντα παρούσες σε ένα είδος και πάντα απούσες σε άλλα και αντιστόφως) κυμάνθηκαν από 11 μεταξύ των ειδών *M. barbatus* και *M. surmulletus* μέχρι 27 μεταξύ των ειδών *M. barbatus* και *P. prayensis* (Πίνακας 4). Μεταξύ των ειδών ο βαθμός της εκτιμηθείσας ετεροζυγωτίας σύμφωνα με συνολικά δεδομένα από όλα τα εκκινητικά μόρια κυμάνθηκε από 0,072 (*M. barbatus*) μέχρι 0,173 (*M. surmulletus*) (Πίνακας 4).

Οι γενετικές αποστάσεις που υπολογίσθηκαν από συνδυασμένα στοιχεία για όλους τους εκκινητές διέφεραν ανάλογα με την ταξινομική θέση του κάθε είδους και η απόσταση (D) του Nei κυμάνθηκε από 0,327 μεταξύ των ειδών *M. barbatus* και *M. surmulletus* μέχρι 0,655 μεταξύ των ειδών *M. barbatus* και *P. prayensis*. Ωστόσο, η ανάλυση RAPD έδειξε ότι το *P. prayensis* ήταν γενετικά το πιο διαφοροποιημένο από τα είδη του γένους *Mullus* (Πίνακας 6). Οι δύο μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των δενδρογραμμάτων παρήγαγαν ίδια αποτελέσματα (Εικόνες 4 και 5).

### 3. Δεδομένα mtDNA

Τα πολλαπλασιαζόμενα τμήματα του κυτοχρώματος b, COII και 12s-16s rRNA είχαν ένα μέσο μέγεθος 380, 660 και 2060 bp (ζευγάρια βάσεων) αντίστοιχα. Οκτώ, δώδεκα και δώδεκα από τα δεκατέσσερα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για τα τέσσερα είδη είχαν τουλάχιστον μία θέση αναγνώρισης στο κυτόχρωμα b, στο COII και στο 12s-16s rRNA τμήματα αντίστοιχα, σε τουλάχιστον ένα είδος (Πίνακας 5). Το πρότυπο περιορισμού που δημιουργήθηκε από το BstUI στο COII ήταν ταυτόσημο για όλα τα είδη. Αυτά τα ένζυμα χρησιμοποιήθηκαν για έλεγχο ρουτίνας των ειδών σε κάθε τμήμα και παρήγαγαν, στο σύνολο των ενισχυμένων τμημάτων, ένα σύνολο από 82 θέσεις περιορισμού που αντιστοιχούν σε 409 bp. Τα πρότυπα πέψης που παράχθηκαν από το κάθε ένζυμο παρουσιάζονται στον πίνακα 3. Τα διαγνωστικά πρότυπα πέψεως, από τα 91 που παρήχθησαν από όλα τα ένζυμα περιορισμού για τα τρία τμήματα κυμάνθηκαν από 14 μεταξύ των ειδών *M. barbatus* και *M. surmulletus* έως 25 μεταξύ των ειδών *M. barbatus* και *P. prayensis*. Ενδοειδικός πολυμορφισμός ανιχνεύθηκε για τα 12s-16s rRNA και COII τμήματα με διαφορετικά ένζυμα περιορισμού, αλλά σε πολύ χαμηλά επίπεδα και όχι

**Πίνακας 5.** Τα μεγέθη των τμημάτων (σε ζεύγη βάσεων) των πολυμορφικών προτύπων που παρατηρήθηκαν στο mtDNA για το κυτόχρωμα b, το COII και το 12s-16s rRNA, ανάμεσα στα 4 είδη (1 = *M. barbatus*, 2 = *M. surmuletus*, 3 = *U. moluccensis*, 4 = *P. prayensis*).

Κυτόχρωμα b																
<i>Hae</i> III	1,2	3	4		<i>Dde</i> I	1	2	3,4		<i>Hinc</i> II	1,2	3,4		<i>Ase</i> I	1,2,3	4
245			-		340	-				380		-		380	-	
195	-				320			-		220	-			200		-
150		-			280		-			160	-			180		-
135	-	-	-		60		-	-								
95		-			40	-	-									
50	-															
<i>Alu</i> I	1	2,3,4		<i>Bst</i> UI	1,2	3,4		<i>Ban</i> I	1,2	3,4			<i>Hinf</i> I	1,2	3,4	
380	-			380		-		380	-				380		-	
270		-		240	-			210	-				300	-		
110		-		140	-			170	-				80	-		
COII																
<i>Dde</i> I	1,3	2	4		<i>Alu</i> I	1	2,3	4		<i>Hinf</i> I	1,2	3	4			
660	-				350			-		360		-				
340		-	-		210		-			225	-					
320		-			190	-	-	-		210	-	-	-			
120			-		185	-				190			-			
90			-		120	-	-	-		165			-			
70			-		115	-				135	-					
40			-		90		-			90	-	-	-			
					50	-	-									
<i>Hae</i> III	1	2,3,4		<i>Ase</i> I	1,2	3,4		<i>Ban</i> I	1,2,3	4			<i>Pst</i> I	1,2,4	3	
460	-	-		660	-			660	-				660	-		
200		-		270		-		540	-				370		-	
100	-			240	-			120	-				290		-	
60	-			150		-										
40	-															
<i>Eco</i> RI	1,2,4	3		<i>Hinc</i> I	1	2,3,4		<i>Msp</i> I	1,3,4	2			<i>Ava</i> II	1,3,4	2	
660	-			660		-		660	-				660	-		
420		-		510	-			540		-			530		-	
240		-		150	-			110		-			130		-	
12s-16s	rRNA															
<i>Bam</i> HI	1,2,3	4		<i>Bst</i> UI	1,2	3	4		<i>Ban</i> I	1	2,4	3		<i>Xba</i> I	1,2,4	3
2060	-			2060			-		2060		-			2060	-	
1900		-		1550		-			1560			-		1900		-
160		-		1050	-				1340	-				160		-
				510	-	-			500	-		-				
				500	-				220	-						
<i>Hinc</i> I	1,2,3	4		<i>Ase</i> I	1,2	3	4		<i>Msp</i> I	1,2,4	3					
1360	-			2060	-				740		-					
750		-		1440		-			600	-						
700	-	-		1160			-		510	-						
610		-		900			-		500	-	-					
				600		-			260	-	-					
									250		-					
									190	-	-					
									120		-					



Πίνακας 5 συνέχεια

<i>Hae</i> III	1	2	3	4	<i>Alu</i> I	1	2	3	4	<i>Dde</i> I	1	2	3	4
1190	-				700	-	-			700			-	-
1100			-		535				-	640	-	-		
740		-			470	-		-	-	540		-	-	-
620				-	380		-	-		500	-			
580		-			360			-		440				-
520		-			330			-		330		-		
500			-		260		-		-	310	-	-		
440				-	220	-	-		-	280	-			
420				-	170	-		-	-	240	-	-	-	-
350	-				150	-	-		-	190			-	
280				-	145				-	140			-	-
240			-		110	-	-	-	-	130			-	
220	-	-	-	-	90	-	-	-		120			-	
180	-				80	-	-	-		90	-			
120	-				70	-	-	-						
80				-										
<i>Hin</i> fI	1	2	3	4	<i>Ava</i> II	1	2	3	4					
1400	-		-		1510	-								
1190				-	1200		-							
950		-			900			-	-					
660		-	-	-	750			-						
450	-	-			470				-					
210	-			-	410			-						
					310		-							
					280		-		-					
					240	-			-					
					230	-								
					170		-		-					
					100		-							
					80	-								

σε όλα τα είδη. Για αυτό η στατιστική ανάλυση εφαρμόσθηκε στους κύριους απλότυπους του κάθε είδους.

Οι κατά ζεύγη εκτιμήσεις της γενετικής απόκλισης μεταξύ των τεσσάρων ειδών κυμάνθηκαν από 12,4% μεταξύ των δύο συγγενικών ειδών μέχρι 28,7% μεταξύ των ειδών *M. barbatus* και *P. prayensis*. Το *Pseudopeneus prayensis* ήταν γενετικά το πιο διαφοροποιημένο από τα είδη του γένους *Mullus* (Πίνακας 6). Τα δύο δένδρογράμματα που προκύπτουν από τις αναλύσεις neighbour-joining και φειδωλότητας παρουσιάζονται στις εικόνες 4 και 5 και εμφανίζουν την ίδια τοπολογία.

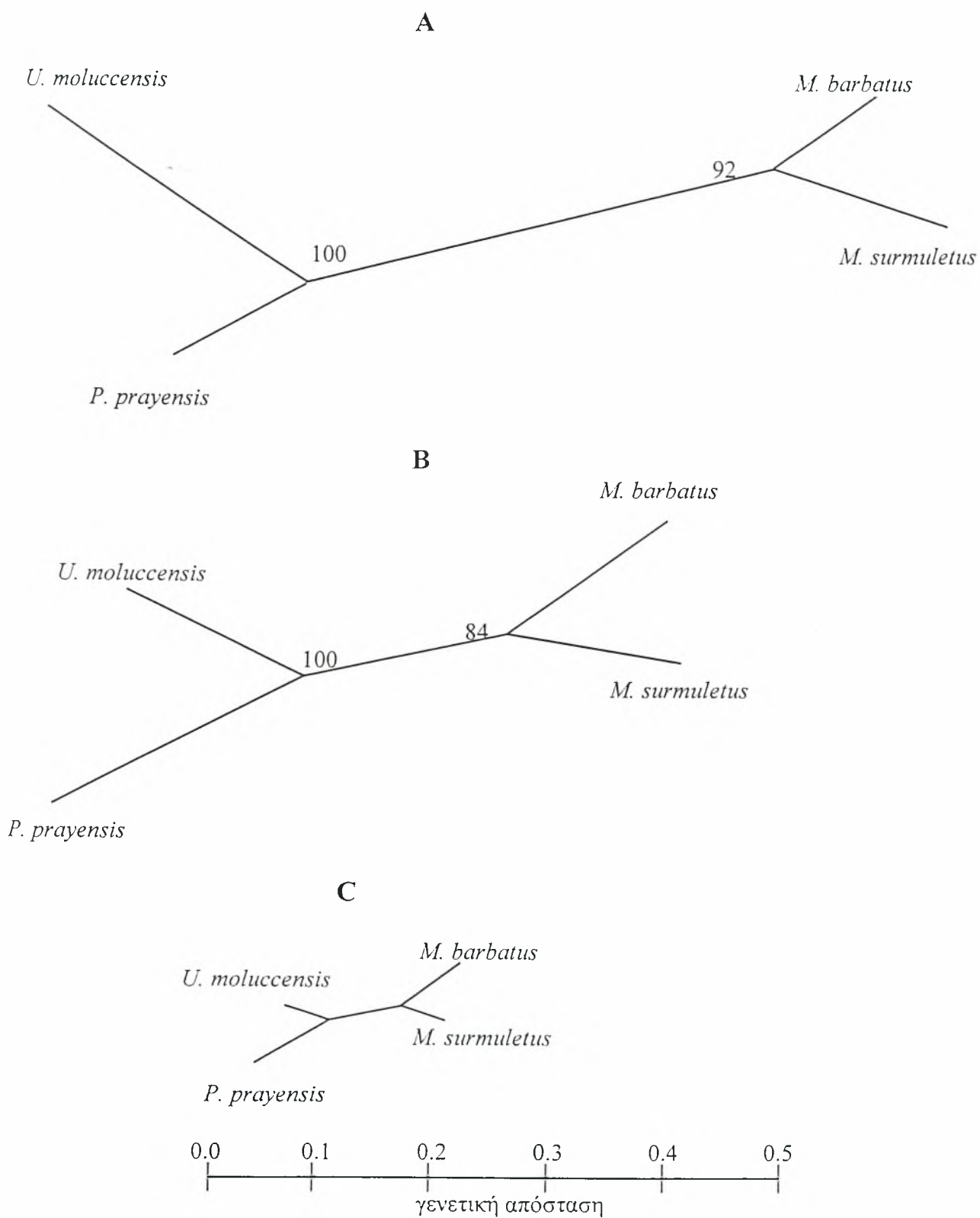
**Πίνακας 6.** Οι τιμές των γενετικών αποστάσεων (*D*) του Nei για τα ισοένζυμα και τα RAPDs και της γενετικής απόκλισης (*δ*) για το mtDNA για όλες τις συγκρίσεις μεταξύ των 4 ειδών. Οι τιμές στις παρενθέσεις δείχνουν το ποσοστό των διαγνωστικών γονιδιακών τόπων (ισοένζυμα, RAPDs) και των διαφορετικών προτύπων κοπής (mtDNA) που ανιχνεύτηκαν μεταξύ των ειδών.

Είδη	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>δ</i>
	Ισοένζυμα	RAPDs	mtDNA
<i>M. barbatus</i> - <i>M. surmuletus</i>	0.316 (16.66)	0.327 (18.64)	12.4 (15.38)
<i>M. barbatus</i> - <i>U. moluccensis</i>	1.023 (55,55)	0.574 (33.87)	23.4 (26.37)
<i>M. barbatus</i> - <i>P. prayensis</i>	0.913 (50.00)	0.655 (40.29)	28.7 (27.47)
<i>M. surmuletus</i> - <i>U. moluccensis</i>	1.237 (61.11)	0.526 (25.00)	21.7 (25.27)
<i>M. surmuletus</i> - <i>P. prayensis</i>	0.737 (44.44)	0.620 (38.87)	22.6 (25.27)
<i>U. moluccensis</i> - <i>P. prayensis</i>	0.606 (38.88)	0.479 (30.64)	17.1 (21.97)

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη τρεις μέθοδοι (ισοένζυμα, RAPDs και ανάλυση PCR-RFLP του mtDNA) εφαρμόστηκαν για να προσδιορίσουμε τις φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ τεσσάρων ειδών της οικογένειας Mullidae. Θα είχε ενδιαφέρον να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν από την εφαρμογή των τριών αυτών προσεγγίσεων στα ίδια άτομα, δεδομένου ότι η κάθε μέθοδος παράγει δείκτες που ανήκουν σε διαφορετικά μέρη του γονιδιώματος. Τα περισσότερα από τα ισοένζυμα κωδικοποιούνται από περιοχές που είναι μοναδικά αντίγραφα του γονιδιώματος και εξελίσσονται πολύ πιο αργά από ότι οι αλληλουχίες DNA που δεν αντιγράφονται. Η τεχνική RAPD, εκτός από μοναδικά τμήματα, επίσης ενισχύει το DNA από υψηλά επαναλαμβανόμενες μη κωδικοποιούσες περιοχές (Williams *et al*, 1990). Το mtDNA είναι απλοειδές, σχεδόν μητρικά κληρονομούμενο και εξελίσσεται γρηγορότερα από το πυρηνικό DNA, παρόλο που οι τρεις περιοχές που εξετάζονται εδώ είναι γνωστό ότι είναι πολύ συντηρητικές μεταξύ των σπονδυλωτών, συμπεριλαμβανομένων και των ψαριών (Kocher *et al*, 1989).

Όλοι οι ενζυμικοί τύποι που εξετάστηκαν παρήγαγαν συγκεκριμένα πρότυπα, τα οποία αντιστοιχούσαν σε γνωστές δομές ενζυμικών υποομάδων για όλα τα είδη. Οσον αφορά την ανάλυση του mtDNA, το κύριο πρόβλημα αφορούσε την επιλογή των τμημάτων του mtDNA. Αρχικά ελέγχθηκαν δύο ακόμα ζεύγη εκκινητών που ενίσχυσαν την ND-5/6 περιοχή (Cronin *et al*, 1993) και τα τμήματα του βρόγχου D (Palumbi *et al*, 1991), αλλά και τα δύο ζεύγη απέτυχαν στο να παράγουν προϊόντα ενίσχυσης με όλα τα είδη. Ένα σοβαρό πρόβλημα που προκύπτει μετά την εφαρμογή της τεχνικής RAPD, εκτός από τη σχετική της αστάθεια, που έχει συζητηθεί εκτεταμένα (Hadrys *et al*, 1992, Lynch & Milligan, 1994, Naish *et al*, 1995), είναι η ομολογία μεταξύ συγχρόνως μετακινούμενων ζωνών που παράγονται από τον ίδιο τυχαίο εκκινητή σε διαφορετικά άτομα. Η ομολογία μεταξύ συγχρόνως μετακινούμενων ζωνών φαίνεται να είναι μια καλή υπόθεση όταν άτομα προέρχονται από τον ίδιο πληθυσμό ή τα ίδια είδη. Αντίθετα, αυτή η υπόθεση μπορεί να μην αληθεύει όταν τα άτομα που εξετάζονται ανήκουν σε διαφορετικά είδη ή προέρχονται από γενετικά αποκλίνοντες πληθυσμούς (Allegrucci *et al*, 1995). Στην παρούσα μελέτη, πειράματα που διεξήχθησαν με ένζυμα περιορισμού έδειξαν ότι, τουλάχιστον 10% (2/20) των ζωνών που εξετάστηκαν, πιθανώς να είχαν παραχθεί από διαφορετικά μέρη του γονιδιώματος. Εφόσον δεν διεξήχθησαν ίδιοι έλεγχοι για όλες



**Εικόνα 4.** Neighbour-joining δένδρογράμματα που βασίζονται στις γενετικές αποστάσεις του Nei (1978) για τα ισοένζυμα (A), RAPDs (B) και mtDNA (C). Οι αριθμοί δείχνουν τις ανακατατάξεις για 2000 αντίγραφα.

τις ταυτόχρονα μετακινούμενες ζώνες που προέκυψαν, πιθανώς να έγιναν κάποια δευτερεύοντα λάθη στην εκτίμηση της προέλευσης των ζωνών αυτών, κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης.

Και οι τρεις μέθοδοι ήταν επιτυχείς ως προς τη διάκριση των ειδών της οικογένειας *Mullidae*, παράγοντας άλλοτε διαγνωστικούς δείκτες (ισοένζυμα και RAPD), εάν και σε διαφορετικό ποσοστό ή διαφορετικά πρότυπα περιορισμού (mtDNA). Τα αποτελέσματα που αφορούν τα επίπεδα της ενδοειδικής ετεροζυγωτίας που παρατηρήθηκαν με τα ισοένζυμα και εκτιμήθηκαν με την μέθοδο RAPD, συνέπιπταν για όλα τα είδη. Και οι δύο μέθοδοι έδειξαν σχετικά χαμηλότερο επίπεδο ετεροζυγωτίας στο *M. barbatus* ( $H_o=0,084$ ,  $H_e=0,105$  για τα ισοένζυμα και  $H_i=0,702$  για τα RAPDs) και σχετικά υψηλότερο επίπεδο στο *M. surmuletus* ( $H_o=0,165$ ,  $H_e=0,166$  για τα ισοένζυμα και  $H_i=0,173$  για τα RAPDs). Ωστόσο τα ισοένζυμα έδειξαν ότι το *U. moluccensis* είχε υψηλότερο βαθμό ετεροζυγωτίας από το *P. prayensis* ( $H_o=0,126$ ,  $H_e=0,118$  και  $H_o=0,086$ ,  $H_e=0,103$  αντιστοίχως), αλλά η μέθοδος RAPDs δεν το επιβεβαίωσε αυτό ξεκάθαρα ( $H_i=0,129$  και  $H_i=0,123$ , αντίστοιχα). (Πίνακες 3 και 4). Οι έλεγχοι  $\chi^2$  έδειξαν σημαντικές αποκλίσεις από τις εκτιμήσεις των Hardy-Weinberg σε αρκετούς πολυμορφικούς τόπους, ειδικά για τα είδη *U. moluccensis* και *P. prayensis*, αποδεικνύοντας ότι αυτά τα δείγματα δεν είχαν ληφθεί από ένα μόνο παμμικτικό πληθυσμό.

Και οι τρεις μέθοδοι έδειξαν ότι οι γενετικές αποστάσεις ήταν μικρότερες μεταξύ των ειδών *U. moluccensis* και *P. prayensis* από ότι μεταξύ αυτών των ειδών και των ειδών της τάξης *Mullus*. Η μοναδική ασυμφωνία που παρατηρήθηκε ήταν ότι, ενώ για τα ισοένζυμα, τα δύο είδη *Mullus* βρέθηκαν γενετικά περισσότερο διαφοροποιημένα από ότι το *U. moluccensis* από το *P. prayensis*, η ανάλυση των RAPDs και του mtDNA έδειξε το αντίστροφο. Επιπλέον, ο έλεγχος Mantel, που αφορούσε 1000 τυχαίες αναδιατάξεις, έδειξε ότι δεν υπήρχε συσχέτιση ( $r$ ) μεταξύ των πινάκων γενετικής απόστασης που βρέθηκαν με τα ισοένζυμα και τα RAPDs ( $r=0,61$ ,  $P=0,202$ ) ή το mtDNA ( $r=0,71$   $P=0,17$ ). Αντιθέτως, οι πίνακες των γενετικών αποστάσεων μεταξύ RAPD και mtDNA βρέθηκαν να έχουν συσχέτιση σε σημαντικό βαθμό ( $r=0,95$ ,  $P=0,038$ ). Μικρές ή μεγάλες διαφορές μεταξύ φυλογενετικών σχέσεων που εκτιμήθηκαν με πυρηνικούς και μιτοχονδριακούς δείκτες, έχουν παρατηρηθεί σε αρκετές περιπτώσεις (Ward & Grewe, 1994). Αυτή η έλλειψη ταύτισης μπορεί να προκύψει από τους διαφορετικούς τρόπους εξέλιξης των δύο αυτών γενετικών συστημάτων. Ωστόσο, είναι δύσκολο να εξηγήσουμε τη μεγαλύτερη

ομοιότητα των δεδομένων RAPD με το mtDNA από ότι με τα ισοένζυμα, δεδομένου ότι και τα ισοένζυμα και τα RAPDs είναι δείκτες του πυρηνικού γονιδιώματος. Εκτός από το να είναι τυχαία, η διαφορά μεταξύ των δεδομένων των ισοενζύμων και της τεχνικής RAPD μπορεί να οφείλεται στη μεγαλύτερη ποσότητα γενετικών δεικτών που ανιχνεύθηκαν από τα RAPDs και/ή στα διαφορετικά μέρη του γονιδιώματος που αναλύθηκαν από τις δύο μεθοδολογίες (Williams *et al*, 1990, Allegrucci *et al*, 1995). Είναι πιθανό ότι τα ισοένζυμα διαθέτουν διαφορετικούς εξελικτικούς ρυθμούς που οφείλονται στη μεγαλύτερη ανταπόκρισή τους στην επιλεκτική πίεση, σε σύγκριση με τους μη-εκφρασμένους δείκτες DNA (Karl & Avise, 1992) όπως είναι τα RAPDs. Τα διαφορετικά επίπεδα ενδοειδικού πολυμορφισμού, τα οποία εκτιμήθηκαν από την κάθε μέθοδο μπορούν επίσης να τροποποιήσουν μερικώς την όλη εικόνα των ενδοειδικών σχέσεων. Τα ισοένζυμα αποκάλυψαν υψηλά επίπεδα γενετικής ποικιλότητας με το  $P_{99}$  να κυμαίνεται από 0,22 σε 0,39 και το  $H_o$  από 0,084 σε 0,165 (με το μέσο όρο όλων των θαλάσσιων τελεόστεων να εκτιμάται ως 0,055) (Πίνακας 3). Για τα RAPDs η ενδοειδική ποικιλότητα ήταν τόσο μεγάλη όσο για τα ισοένζυμα, με το  $H_i$  να κυμαίνεται από 0,072 σε 0,173 (Πίνακας 4). Παρόλα αυτά, εξαιτίας της ιδιότητας της κυριαρχίας που εκφράζουν οι δείκτες RAPD, οι προηγούμενες τιμές είναι υπό αμφισβήτηση. Αντίθετα, ο παρατηρούμενος ενδοειδικός πολυμορφισμός με την ανάλυση mtDNA ήταν εξαιρετικά χαμηλός. Τα φυλογενετικά δέντρα neighbour-joining που προέκυψαν από τις τρεις μεθόδους, συνόψισαν τις διαφορές που παρατηρήθηκαν στις γενετικές αποστάσεις, ειδικά στα ισοένζυμα (Εικ. 4). Από την άλλη μεριά, φυλογενετικά δέντρα που βασίζονταν στη μέθοδο φειδωλότητας των διακριτών χαρακτήρων, αποκάλυψαν πανομοιότυπα αποτελέσματα για τις τρεις τεχνικές (Εικ.5). Αυτή η ομοιότητα μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι, αντίθετα από τις αναλύσεις που βασίζονται σε γενετικές αποστάσεις, η ανάλυση των διακριτών χαρακτήρων με τη μέθοδο φειδωλότητας παραβλέπει τις πληροφορίες που περιέχονται στις αλληλομορφικές συχνότητες.

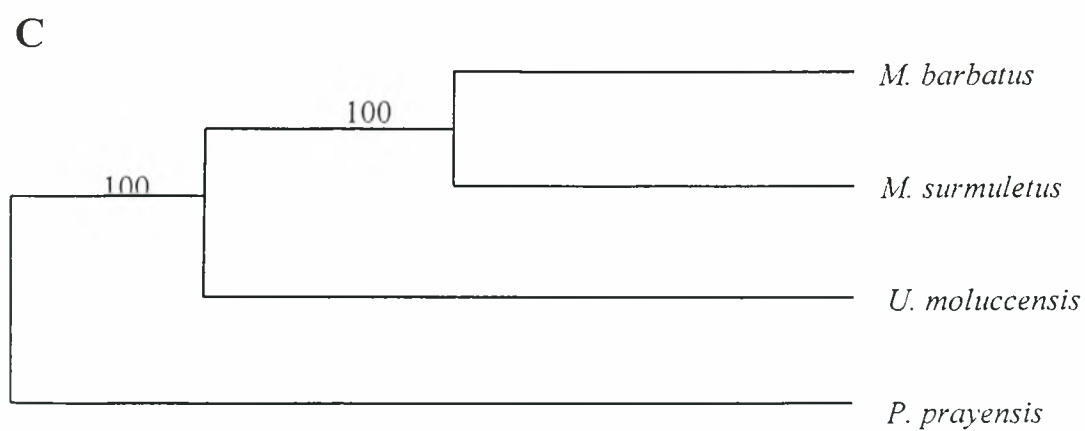
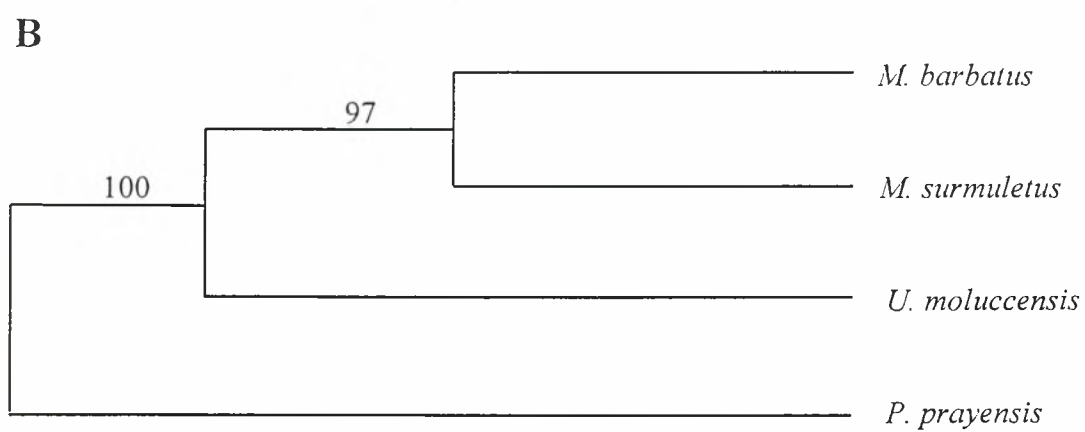
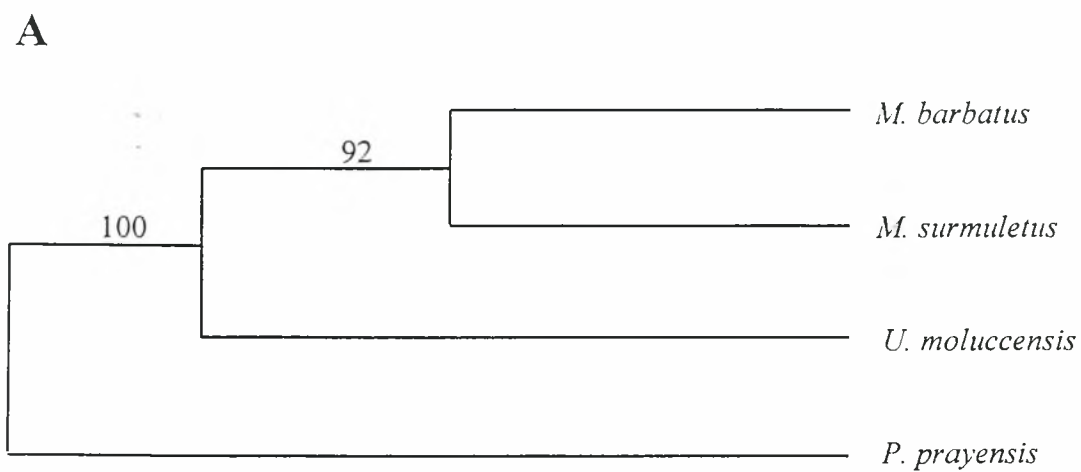
Όλες οι μέθοδοι ήταν επιτυχείς στο να αποκαλύψουν τη ταξινομική θέση των τεσσάρων ειδών. Για τα ισοένζυμα, όλες οι τιμές συμπεριλαμβάνονται μέσα στα όρια των τυπικών τιμών των γενετικών αποστάσεων, οι οποίες διαχωρίζουν διαφορετικές τάξεις στα ψάρια (Avise & Aquadro, 1982). Οι μέσες γενετικές αποστάσεις που παρατηρήθηκαν από τους συγγραφείς για τους οστειχθύες είναι  $D=0,36$ ,  $0,60$  μέσα στα γένη και  $D=1,13$ ,  $0,76$  μεταξύ των γενών. Η γενετική απόσταση που μετρήθηκε από τα ισοένζυμα μεταξύ των ειδών *M.barbatus* και *M.surmuletus* ( $D=0.316$ ) ήταν



κοντά σε αυτή που βρέθηκε σε προηγούμενη μελέτη ( $D=0,329$ , Mamuris *et al*, 1998a), αλλά δεν συμφωνεί με την απόσταση που βρέθηκε από τους Camarata *et al*, 1991 ( $D=0,068$ ). Αυτή η διαφορά μπορεί να αποδοθεί είτε στις διαφορές στις πειραματικές διαδικασίες ή στα διαφορετικά ενζυμικά συστήματα που εξετάστηκαν.

Για τα RAPDs υπάρχουν λίγες πληροφορίες που αφορούν παρόμοιες μελέτες σε ψάρια. Η τιμή της γενετικής απόστασης που υπολογίσθηκε μεταξύ των δύο ειδών *Mullus* ( $D=0,327$ ) ήταν παρόμοια με εκείνη που βρέθηκε σε προηγούμενη μελέτη ( $D=0,42$ , Mamuris *et al*, 1998b). Φυλογενετικές μελέτες στα *Oreochromis*, βασισμένες στα RAPDs, αποκάλυψαν γενετικές αποστάσεις που κυμαίνονται από 0,161 έως 0,274 μεταξύ ειδών ή υποειδών του *O.niloticus* (Naish *et al*, 1995) και από 0,25 έως 0,35 μεταξύ συγγενών ειδών (Bardaki & Skibinski, 1994). Σε προηγούμενες μελέτες, οι γενετικές αποστάσεις που υπολογίσθηκαν μεταξύ πληθυσμών του *M.barbatus* (μέσος όρος  $D=0,015$ ) και του *M.surmuletus* (μέσος όρος  $D=0,018$ ) με τα RAPDs ήταν ελαφρώς μεγαλύτερες, συγκρινόμενες με τα ισοένζυμα (μέσοι όροι  $D=0,006$  και  $D=0,011$  αντίστοιχα) (Mamuris *et al*, 1998a,b και αδημοσίευτα δεδομένα). Εντούτοις, στην παρούσα μελέτη, οι τιμές  $D$  μεταξύ των ειδών για τα ισοένζυμα ήταν υψηλότερες από ότι εκείνες για τα RAPDs (Πίνακας 6). Αυτό ενδεχομένως να σημαίνει είτε ότι πέρα από ένα συγκεκριμένο ταξινομικό επίπεδο, τα ισοένζυμα είναι περισσότερο ικανά να εντοπίζουν μια μεγαλύτερη διαειδική απόκλιση από ότι τα RAPDs, είτε ότι ο αριθμός των διαγνωστικών ζωνών μεταξύ των ειδών υποτιμήθηκε στα RAPDs, εξαιτίας της σύγχρονης μετακίνησης. Η σύγκριση των διαγνωστικών δεικτών επίσης έδειξε ένα υψηλότερο επίπεδο διαειδικής απόκλισης που καθορίσθηκε από τα ισοένζυμα σε σύγκριση με τα RAPDs. Αν και για όλες τις συγκρίσεις ζευγών, οι απόλυτοι αριθμοί διαγνωστικών δεικτών που ανιχνεύθηκαν ήταν μεγαλύτεροι για τα RAPDs από ότι για τα ισοένζυμα (Πίνακες 3 και 4), τα ποσοστά (αριθμός διαγνωστικών τόπων / συνολικός αριθμός εξεταζόμενων τόπων) έδειξαν το αντίστροφο, τουλάχιστον για τις συγκρίσεις μεταξύ μη συγγενικών ειδών (Πίνακας 6).

Μια άμεση σύγκριση γενετικής απόκλισης που προέκυψε από την ανάλυση mtDNA μεταξύ των ειδών *Mullidae* με δεδομένα από άλλα ψάρια ήταν επίσης δύσκολη, εξαιτίας των διαφορετικών προσεγγίσεων που χρησιμοποιήθηκαν (άμεση ανάλυση της ακολουθίας mtDNA ή ολική πέψη mtDNA). Ωστόσο, οι εκτιμήσεις της διαειδικής απόκλισης ήταν παρόμοιες με εκείνες που μετρήθηκαν, με διαφορετική



**Εικόνα 5.** Φυλογενετικά δέντρα που βασίζονται στην ανάλυση φειδωλότητας για τα ισόένζυμα (A), RAPDs (B) και mtDNA (C). Οι αριθμοί δείχνουν τις ανακατατάξεις για 2000 αντίγραφα.

ωστόσο προσέγγιση, για σκομβροειδή, όπως αναφέρεται από τους Scoles *et al* (1998).

Συμπερασματικά, οι τρεις μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν εδώ παρήγαγαν παρόμοια αποτελέσματα και σε γενική συμφωνία με εκείνα που βρέθηκαν για άλλα είδη ψαριών. Τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των δεικτών των ισοενζύμων και του mtDNA σε φυλογενετικές μελέτες εξετάστηκαν εκτενώς σε αρκετά άρθρα (Avisé, 1994, Ward & Grewe, 1994, Carvalho & Hauser, 1994). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι απουσία επαρκούς ποικιλότητας στα ισοένζυμα και στο mtDNA, τα RAPDs μπορούν να είναι πολύτιμα στην επίλυση ταξινομικών προβλημάτων στα ψάρια (Bardaki & Skibinski, 1994, Naish *et al*, 1995, Callejas & Ochando, 1998). Κατά την διάρκεια της έρευνας αυτής και παρά τις υποθέσεις που πρέπει να γίνουν για να αναλύσουμε τα δεδομένα, τα RAPDs σε σύγκριση με τα ισοένζυμα και το mtDNA αποδείχτηκαν αξιόπιστα στον καθορισμό της ταξινομικής θέσης των τεσσάρων ειδών. Παρόλα αυτά, η επαρκής ποικιλομορφία στα ισοένζυμα και στο mtDNA και το γεγονός ότι τα RAPDs δεν πρόσφεραν καμιά επιπρόσθετη πληροφορία, καθιστούν τη χρήση τους χαμηλής σημασίας, τουλάχιστον για περαιτέρω φυλογενετικές και ταξινομικές μελέτες για τα είδη της οικογένειας *Mullidae*. Από την άλλη μεριά, το πλεονέκτημα της τεχνικής RAPD ως προς τις άλλες δύο μεθόδους ήταν η διακριτική του ικανότητα. Μόνο δύο (PGI-1 και PGM) από τους 18 ενζυμικούς τόπους αναλύθηκαν και μόνο 6 (DdeI στο κυτόχρωμα b και AluI, Avall, DdeI, HaeIII και HinfI στο 12S-16S rRNA) από τις 42 πέψεις που έγιναν στα τρία τμήματα του mtDNA, ήταν ικανές να διακρίνουν ταυτόχρονα και με σαφήνεια τα τέσσερα είδη (Πίνακας 3 και 5). Αντίθετα, κάθε τυχαίος εκκινητής RAPD που χρησιμοποιήθηκε, παρήγαγε ένα μοναδικό πρότυπο ζωνών για το κάθε είδος. Επομένως, αν είναι απαραίτητο (π.χ. αναγνώριση ρουτίνας συμπατρικών ειδών ψαριών κατά τη διάρκεια των νεαρών σταδίων ή της κατανομής αυγών, χωρίς προηγούμενες πληροφορίες για τις δομές ισοενζύμων ή mtDNA), τα RAPDs μπορούν να υποσχεθούν πολύ περισσότερα από ότι οποιαδήποτε άλλη μοριακή μέθοδο.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Allegretti, G., Caccone, A., Cataudella, S. & Powell, J. R. (1995). Acclimation of the European sea bass to freshwater: monitoring genetic changes by RAPD polymerase chain reaction to detect DNA polymorphisms. *Marine Biology* **121**, 591-599.
- Allendorf, F. W., N. Mitchell, N. Ryman & G. Stahl, 1977. Isozyme loci in brown trout (*Salmo trutta* L.) detection and interpretation from population data. *Heredity* **86**, 179-19.
- Αποστολίδης, Α. (1996) Μελέτη της βιοχημικής και μοριακής γενετικής ποικιλότητας πληθυσμών της πέστροφας (*Salmo trutta* L) της Ελλάδας. Διδακτορική Διατριβή, Θεσσαλονίκη.
- Avise, J. C. (1994). Molecular markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall, New York.
- Avise, J. C. & Aquadro C. F. (1982). A comparative summary of genetic distances in the vertebrates: patterns and correlations. *Evolutionary Biology* **15**, 151-185.
- Baldwin, J., P. S. Lake & T. W. Moon, 1987. Immunochemical evidence that the single lactate dehydrogenase of lampreys is more similar to LDHB<sub>4</sub> than to LDHA<sub>4</sub> of Hagfish. *The Journal of Experimental Zoology*, **241**, 1-8.
- Bardakci, F. & Skibinski, D. O. F. (1994). The application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity* **73**, 117-123.
- Bernatchez, L., Savard, L., Dodson, J. & Pallota, D. (1988). Mitochondrial DNA sequence heterogeneity among James-Hudson Bay anadromous coregoninines. *Finnish Fisheries Research* **9**, 17-26.
- Birky, C. W. J., T. Maruyama & P. Fuerst (1983). An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics*, **103**, 513 - 527.
- Black. W. C., Du Teau N.M., Puterka, G.J., Nechols, J. R., Pettorini, J. M. (1992). Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD - PCR) to

- detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera Aphididae). *Bulletin of Entomological Research*, **82**, 151 - 159.
- Borowsky, R. L., McClelland, M., Cheng, R. & Welsh, J. (1995). Arbitrarily primed DNA fingerprinting for phylogenetic reconstruction in Vertebrates: the Xiphophorus model. *Molecular Biology and Evolution* **12**, 1022-1032.
- Brown, W. M. (1985). The mitochondrial genome of animals. In: Molecular Evolutionary Genetics, R. J. Macintyre (eds.), Plenum Press, New York, pp 95 - 130.
- Callejas, C. & Ochando, M. D. (1998). Identification of Spanish barbel species using the RAPD technique. *Journal of Fish Biology* **53**, 208-215.
- Cammarata, M., Parrinello, N. & Arculeo, M. (1991). Biochemical taxonomic differentiation between *Mullus barbatus* and *Mullus surmuletus* (Pisces, Mullidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* **99B**, 719-722.
- Carvalho, G.R. & Hauser, L. (1994). Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **4**, 326-350.
- Cenis, J.L., Perez, P., Fereres, A. (1993). Identification of aphid (Homoptera, Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **86**, 545 - 550.
- Cronin, M. A., Spearman, W. J., Wilmot, R. L., Patton, J. C. & Bickham, J. W. (1993). Mitochondrial DNA variation in chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum (*O. keta*) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **50**, 708-715.
- Dewayne Shoemaker, D. Ross, K.G., Arnold, M.L. (1994). Development of RAPD markers in two introduced fire ants, *Solenopsis invicta* and *S. richeri*, and their application to the study of a hybrid zone. *Molec. Ecol.* **3**, 531 - 539.
- Dinesh, K. R., Lim, T. M., Chan, W. K. & Phang V. P. E. (1996). Genetic variation inferred from RAPD fingerprinting in three species of tilapia. *Aquaculture International* **4**, 19-30.
- Felsenstein, J. (1993). PHYLIP (Phylogeny inference package) version 3.5c. Department of Genetics, SK-50, University of Washington, Seattle, WA.

- Ferguson, M. M. & Danzmann, R. G. (1998). Role of genetic markers in fisheries and aquaculture: useful tools or stamp collecting? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **55**, 1553-1563.
- Golani, D. (1994). Niche separation between colonizing and indigenous goatfish (Mullidae) along the Mediterranean coast of Israel. *Journal of Fish Biology* **45**, 503-513.
- Guyomard, R. & F. Krieg, 1983. Electrophoretic variation in six populations of brown trout (*Salmo trutta*, L.). *Can. J. Genet. Cytol.*, **25**, 403 - 413.
- Hadrys, H., Balick, M. & Schierwater, B. (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* **1**, 55-64.
- Harris, H. (1966). Enzyme polymorphisms in man. *Proc. R. Soc.* **164 B**, 298 -310.
- Harris, H. & D. Hopkinson, 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in Human Genetics. North Holland publishing company, Amsterdam.
- Johansen, S., P. H. Guddal & T. Johansen (1990). Organization of the mitochondrial genome of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Nucleic Acids Research*, **18**, 411 - 419.
- Karakousis, Y. & Triantaphyllidis, C. (1990). Genetic structure and differentiation among Greek brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Heredity* **64**, 297-304.
- Karl, S. A. & Avise, J. C. (1992). Balancing selection at allozyme loci in oysters: implications from nuclear RFLP's. *Science* **256**, 100-102.
- Kocher, T. D., Thomas, T. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Paabo, S. & Wilson, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 6196-6200.
- Lanfranco, L., Wyss, P., Marzachi, C., Bontante, P. (1995). Generation of RAPD - PCR primers for the identification of isolates of *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhiza fungus. *Molec. Ecol.* **4**, 61 - 68.
- Lewontin, R. C. and Hubby, J.L. (1966). A molecular approach to the study of genic variation in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* **54**, 595 -609.



- Ligny, W. de (1969). Serological and biochemical studies in fish population. *Oceanogr. mar. Biol. Ann. Rev.* **7**, 411 -513.
- Lynch, M. & Milligan, B. G. (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* **3**, 91-99.
- Mailer, R. J., Scarth, Fristensky, b. (1994). Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Theor. Appl. Genet.* **87**, 697 - 704.
- McElroy, D., Moran, P., Bermingham, E. & Kornfield J. (1991). REAP: The Restriction Enzyme Analysis Package, Version, 4.0. Department of Zoology, University of Maine, Orono, ME.
- Mamuris, Z., Apostolidis, A. P. & Triantaphyllidis, C. (1998a). Genetic protein variation in red mullet (*Mullus barbatus*) and striped red mullet (*M. surmuletus*) populations from the Mediterranean Sea. *Marine Biology* **130**, 353-360.
- Mamuris, Z., Apostolidis, A. P., Theodorou, A. J. & Triantaphyllidis, C. (1998b). Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to evaluate intraspecific genetic variation in red mullet (*Mullus barbatus*). *Marine Biology* **132**, 171-178.
- Mantel, N. A. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* **27**, 209-220.
- Meyer, A. (1993). Evolution of mitochondrial DNA in fish. In: Biochemistry and Molecular Biology of Fish, Vol. 2, Hochachka, P. W. & T. P. Mommsen (eds.) Elsevier Press, pp 1-38.
- Moriz, C., T. E. Dowling & W. M. Brown (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA, relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 269 - 292.
- Naish, K. A., Warren, M., Bardakci, F., Skibinski, D. O. F., Carvalho, G. R. & Mair, G. C. (1995). Multilocus DNA fingerprinting and RAPD reveal similar genetic relationships between strains of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). *Molecular Ecology* **4**, 271-274.

- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genetics* **89**, 583-590.
- Normark, B. B., McCune, A., R. & Harrison, R. G. (1991). Phylogenetic relationships of neopterygian fish, inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* **8**, 819-834.
- Palumbi, S. R., Martin, A., Romano, S., McMillan, W. O., Stice, L. & Grabowski, G. (1991). The simple fool's guide to PCR. Department of Zoology, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii, 23 p.
- Rehse, P. & W. Davidson, 1986. Evolutionary relationship of a fish C type lactate dehydrogenase to other vertebrate lactate dehydrogenase isozymes. *Canad. J. Fisheries Aquat. Sciences*, **43**, 1045 -1051.
- Rohlf, F. J. (1990). NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exeter Software, New York.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis & H. A. Erich (1988). Primer detected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487 - 491.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.
- Schierwater, B. & Ender, A. (1993). Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. *Nucleic Acids Research* **21**, 4647-4648.
- Scoles, D. R., Collette, B. B. & Graves, J. E. (1998). Global phylogeography of mackerels of the genus *Scomber*. *Fishery Bulletin* **96**, 823-842.
- Sick, K. (1961). Haemoglobin polymorfism in fishes. *Nature*, **192**, 894 -6.
- Skibinski, D.O.F. (1994). The potential of DNA techniques in the population and evolutionary genetics of aquatic invertebrates. In Beaumont, A. R., ed. Genetics and Evolution of Aquatic Organisms. London Chapman and Hall, pp. 177 -99.
- Σταμάτης, Κ. (1998). Γενετική μελέτη ιχθυαποθεμάτων της κουτσομούρας με τη μέθοδο RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Διπλωματική Διατριβή, Βόλος.

- Sultmann, H., Mayer, W. E., Figueroa, F., Tichy, H. & Klein, J. (1995). Phylogenetic analysis of Cichlid fishes using nuclear DNA markers. *Molecular Biology and Evolution* **12**, 1033-1047
- Swofford, D. L. & Selander, R. B. (1989). BIOSYS-I. A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Release 1.7. Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois.
- Taggart, J., A. Ferguson & F. Mason, 1981. Genetic variation in Irish populations of brown trout (*Salmo trutta* L.) Electrophoretic analysis of allozymes. *Comp. Biochem. Physiol.*, **69B**, 393 -412.
- Waldman, J. R. and Wirgin, I. (1994). Use of DNA analyses in the management of natural fish populations. In Garte, S. J., ed. *Molecular Environmental Biology*. Boca Raton, FL CRC Press, pp. 29 -64.
- Ward, R. D. & Grewe, P. M. (1994). Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **4**, 300-325.
- Welsh, J. & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* **18**, 7213-7218.
- Welsh, J., Peterson, C., Mc Clelland, m.(1991). Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse, application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Res* **19**, 303 -306.
- Whitehead, P.G. P., Bauchot, M. L., Hureau, J. C., Nielsen, J. & Tortonese, E. (Eds). (1986). *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean*. Volumes I, II and III, Paris: UNESCO.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**, 6531-6535.
- Williams, J. G. K., Hanafey, M. K., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. (1993). Genetic analysis using Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology* **218**, 704-740.

- Wilson A. C., R. L. Cann, S. M. Carr, M. George, U. B. Gyllensten, et al. (1985). Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.*, **26**, 375 - 400.
- Wolstenholme, D. R. (1992). Animal mitochondrial DNA, structure and evolution. *International Review of Cytology*, **141**, 173 - 216.

